

# Regulation des STAT6/ Koaktivator Komplexes in der Zytokin induzierten Transkription

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Tobias Münz  
geboren am 06.04.1978

Gutachter: PD Dr. Edith Pfitzner, Jena

Prof. Dr. Karlheinz Friedrich, Jena

Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Datum der Verteidigung: 31.05.2010

Hiermit erkläre ich, Tobias Münz ehrenwörtlich, daß mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist.

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe. Weiterhin habe ich alle von mir benutzten Hilfsmittel, sowie persönliche Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben.

Unterstützung bei der Auswahl und Auswertung des Materials und bei der Herstellung des Manuskriptes erhielt ich ausschließlich durch meine Betreuerin Dr. habil. Edith Pfitzner.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Im Zusammenhang mit dem Inhalt dieser Arbeit wurden weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen vom Promovenden an Dritte gewährt. Über meine Betreuerin hinaus waren keine weiteren Personen an der Herstellung des Manuskriptes beteiligt.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht bereits als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Die vorliegende Dissertation wurde weder in Teilen, noch in Abwandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Außer dem vorliegenden Antrag bei der FSU Jena im Bereich der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät zur Eröffnung des Promotionsverfahrens sind von mir derzeit keine weiteren Promotionsverfahren eröffnet oder in der Vergangenheit eröffnet worden.

Jena, den 25.07.2010

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
3.1	Regulation der Genexpression durch Steuerung der Transkription .....	6
3.2	STAT-Proteine (Signal transducer and activator of transcription).....	7
3.3	Aktivierung der STAT-Proteine .....	8
3.4	Biologische Funktionen von STAT6.....	8
3.5	Phosphorylierung der STATs .....	9
3.6	Transkriptionskoaktivatoren von STAT6.....	10
3.7	Die Familie der NCoA-Koaktivatoren.....	11
3.8	Die physiologischen Funktionen der NCoA Proteine .....	13
3.8.1	NCoA-1 .....	13
3.8.2	NCoA-2 .....	13
3.8.3	NCoA-3 .....	13
3.9	Posttranslationale Modifikationen der NCoAs .....	14
3.10	PP2A .....	16
3.10.1	Physiologische Funktionen .....	16
3.10.2	Der molekulare Aufbau von PP2A .....	16
3.10.3	Die Regulation von PP2A.....	17
3.11	Zellzyklusabhängige Transkriptionsregulation .....	18
<b>4</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Material:.....</b>	<b>22</b>
5.1	Kits und Größenstandardmarker .....	22
5.2	Enzyme .....	22
5.3	Antikörper .....	22
5.4	Chemikalien.....	23
5.5	Inhibitoren für die Zellkultur .....	24
5.6	Materialien für Westernblot.....	24
5.7	Oligonukleotide.....	25
5.8	Vektoren .....	25
5.8.1	Vektoren für die Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	25
5.8.2	Expressionsvektoren zur Überexpression in eukaryotischen Zellen .....	25
5.8.3	Vektoren für Reportergenexperimente .....	26
5.9	Bakterien und deren Medium .....	26
5.10	Zellkulturlösungen .....	26
5.11	Zelllinien (human).....	27
5.12	Geräte .....	27
<b>6</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
6.1	Methoden zum Arbeiten mit Bakterien.....	28
6.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> für die Transformation .....	28
6.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	28
6.1.3	Analytische Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Minipräparation) .....	28
6.1.4	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Maxi-Präparation).....	29
6.2	Methoden zum Umgang mit DNA.....	29
6.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	29
6.2.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme .....	29
6.2.3	5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	29
6.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
6.2.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
6.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
6.2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	30
6.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30

6.2.9	PCR-basierte Mutagenese .....	30
6.3	Methoden zum Umgang mit RNA .....	31
6.3.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	31
6.3.2	Konzentrationsbestimmung von RNA .....	31
6.3.3	Reverse Transkription von RNA.....	31
6.3.4	Quantitative PCR .....	31
6.4	Standard Zellkulturmethoden .....	31
6.4.1	Kultivierung von Zellen.....	31
6.4.2	Passagieren von eukaryotischen Zellen .....	31
6.4.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	32
6.4.4	Zellzahlbestimmung .....	32
6.5	Methoden zum Umgang mit Zellen .....	32
6.5.1	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	32
6.5.2	Transfektion von HEK 293T Zellen mit siRNA .....	33
6.5.3	Transfektion von Ramos B Zellen mit siRNA .....	33
6.5.4	Herstellung von NETN-Gesamtzellextrakten.....	33
6.5.5	Metabolische Markierung von Zellen mit P <sup>32</sup> Phosphat.....	34
6.5.6	Zytoplasma/ Kernfraktionierung .....	34
6.5.7	Messung der Luziferase- / $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten .....	35
6.6	Proteinbiochemische Methoden .....	36
6.6.1	Expression von GST-Fusionsproteinen .....	36
6.6.2	Herstellung von bakteriellen Rohlysaten.....	36
6.6.3	Kopplungstest von GST-Proteinen.....	36
6.6.4	In-vitro Transkription/Translation von Proteinen.....	37
6.6.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
6.6.6	Immunpräzipitation.....	37
6.6.7	Koimmunpräzipitation .....	37
6.6.8	Phosphataseassay.....	38
6.6.9	SDS-Gelelektrophorese .....	38
6.6.10	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....	38
6.6.11	Trocknung von SDS-Gelen .....	39
6.6.12	Westernblot.....	39
6.6.13	Entfernung gebundener Antikörper von Membranen (stripfen) .....	39
6.6.14	Gelretardationsexperimente.....	40
6.6.15	Chromatinimmunpräzipitation .....	41
6.7	<i>In-silico</i> -Untersuchungen und verwendete Programme:.....	42
<b>7</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
7.1	Untersuchung des Einflusses der IL-4 Stimulation auf die Koaktivatorrekrutierung .....	43
7.2	Untersuchung des Beitrags zellulärer Signalwege zur STAT6 / NCoA-1 Interaktion.....	44
7.3	Untersuchung der Wirkung von Serin-Threoninphosphataseinhibitoren auf die Elektromobilität von NCoA-1 .....	45
7.4	STAT6 und NCoA-1 liegen in humanen B-Zellen nach Phosphataseinhibitorbehandlung hyperphosphoryliert vor .....	46
7.5	NCoA-1 ist Substrat von endogenem PP2A .....	47
7.6	NCoA-1 und NCoA-3 binden an die katalytische Untereinheit von PP2A....	48
7.7	Identifikation der Regionen von NCoA-1, die von PP2A reguliert werden ...	49
7.8	Die Inhibition von Serin-/Threoninphosphatasen inhibiert die Interaktion von endogenem STAT6 und NCoA-1.....	50
7.9	PP2A reguliert die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 .....	52

7.10	Die Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A hemmen die STAT6 vermittelte Transkription .....	53
7.11	Die STAT6-vermittelte Transkription ist abhängig von der zellulären PP2A-Phosphataseaktivität .....	56
7.12	Die Phosphataseaktivität von PP2A reguliert die Expression von endogenen Zielgenen in humanen B Zellen .....	57
7.13	Untersuchung der Regulation von PP2A durch IL-4 .....	59
7.14	Untersuchung der Zusammensetzung des Koaktivatorkomplexes: .....	61
7.15	Identifikation der Calyculin A induziert phosphorylierten Aminosäuren .....	63
7.16	Funktionelle Untersuchung der Modifikation von NCoA-1 Ser 395 in Proteininteraktionsstudien und Reportergenversuchen .....	64
7.17	Identifikation der NCoA-1 phosphorylierenden Kinase, die zu verminderter Interaktion von NCoA-1 und STAT6 führt .....	66
7.18	Untersuchung des Zellzyklusses auf die NCoA-1 Phosphorylierung und Interaktion mit STAT6 .....	68
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
8.1	Funktion der Phosphorylierung von STAT6 und NCoA-1 .....	71
8.2	Charakterisierung der Phosphorylierung von NCoA-1 .....	73
8.3	Regulation der NCoA-1 Phosphorylierung .....	76
8.4	Bedeutung der NCoA-1 Phosphorylierung in der Transkriptionsregulation durch STAT6 .....	78
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>92</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>

# 1 Zusammenfassung

STAT-Proteine sind latente Transkriptionsfaktoren mit essentiellen Funktionen, die durch spezifische Stimuli aktiviert werden. STAT6 ist wesentlich an der humoralen Immunantwort durch Weiterleitung extrazellulärer Signale in Form von IL-4 und IL-13 beteiligt. Da STAT6 an Krankheiten wie Allergien oder Asthma und dem Hodgkin-Lymphom beteiligt ist, ist die Untersuchung der STAT6 vermittelten Transkription von besonderem Interesse. Die Transkriptionsaktivierung über STAT6 hängt von der regulierten Rekrutierung von Transkriptionskoaktivatoren ab.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der PP2A regulierten Dehydrophosphorylierung von NCoA-1 auf die STAT6 vermittelte Transkription untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Phosphataseinhibitoren und ein spezifischer Knockdown von PP2A selektiv die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 inhibieren. Die verminderte Rekrutierung korreliert mit einer Hemmung der STAT6 vermittelten Transkription in Reporterassays und verringerter Expression von endogenen STAT6 Zielgenen.

NCoA-1 interagiert wie auch NCoA-3 mit PP2A und wird in Regionen, die die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, sowie in der Interaktionsregion für einen weiteren wichtigen Transkriptionskoaktivator durch Hemmung von Proteinphosphatasen Stimulus unabhängig hyperphosphoryliert. Der für die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 minimal benötigte Bereich von NCoA-1 wird dabei nicht hyperphosphoryliert. PP2A dephosphoryliert NCoA-1, das Substrat Zyklin abhängiger Kinasen (CdK) ist und nicht durch IL-4 Stimulation phosphoryliert wird. Hemmung von CdK2 revertiert die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von NCoA-1 und NCoA-1 wird in der G1, sowie in der S-Phase zellzyklusabhängig phosphoryliert. Dies deutet auf eine Regulation der Interaktion zwischen NCoA-1 und STAT6 durch CdK2 und PP2A als Gegenspieler hin.

Die Lokalisation von PP2A an einem STAT6 Zielgen konnte nicht nachgewiesen werden. Wegen der verstärkten Kernlokalisation der katalytischen Untereinheit von PP2A nach IL-4 Stimulation wird aber eine IL-4 induzierte Bildung eines PP2A Holoenzymkomplexes vermutet. Dieser könnte die STAT6 vermittelte Transkription durch Koaktivatormodifikation regulieren. Die Mutation des Calyculin A induziert phosphorylierten Serin 395 in der PAS Domäne von NCoA-1 zeigte keinen Einfluß auf die Interaktion von NCoA-1 an STAT6. Transient überexprimiertes NCoA-1 verstärkt die STAT6 getriebene Transkription, während NCoA-1 mit Punktmutation von Serin 395 zu Glutaminsäure die Transkription weniger verstärkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine phosphorylierungsabhängige Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 gezeigt werden. Das Verständnis der Regulation der Koaktivatorrekrutierung an STAT6 könnte ein Ansatzpunkt zur Behandlung STAT6 abhängiger Erkrankungen darstellen.

## 2 Summary

STAT proteins are latent transcription factors with essential functions that can be activated by specific stimuli. STAT6 plays an important role in the immune system through transmission of extracellular stimuli by IL-4 and IL-13. STAT6 has critical functions in allergic diseases and the Hodgkin-Lymphoma and is therefore of special interest. The activation of transcription depends on the regulated recruitment of transcriptional coactivators.

This work focused on the role of PP2A dephosphorylating NCoA-1 in the STAT6-dependent transcription. We could show, that phosphatase inhibitors and specific knockdown of PP2A selectively inhibited the interaction of NCoA-1 and STAT6. The diminished recruitment of NCoA-1 correlates with an inhibition of a STAT6 dependent reporter and decreased the expression of endogenous STAT6 target genes.

NCoA-1 interacts with PP2A. Phosphatase inhibitor treatment induces hyperphosphorylation of NCoA-1 specifically at transcription factor and CBP interaction sites. The essential interaction domain of NCoA-1 for the STAT6 binding is excluded from the induced hyperphosphorylation. NCoA-1, which is not phosphorylated upon IL-4 stimulation, is a substrate for cyclin dependent kinases and PP2A. NCoA-1 is specifically phosphorylated in G1 and S-Phase. The inhibition of Cdk2 reverses the Calyculin A-induced hyperphosphorylation of NCoA-1. This suggests that the interaction of NCoA-1 and STAT6 is regulated by the counteraction of Cdk2 and PP2A.

PP2A could not be detected on a STAT6 target gene promoter, but the nuclear localization of the catalytic subunit is enhanced upon IL-4 stimulation. We assume a regulated assembly of the PP2A holoenzyme complex, which could modulate the STAT6 driven transcriptional activation by coactivator dephosphorylation.

Calyculin A treatment induces phosphorylation of Serine 395 in the PAS domain of NCoA-1. Mutation of Serine 395 does not interfere with the binding of NCoA-1 to STAT6. Ectopic expression of wild type NCoA-1 increases STAT6-dependent transcription, while the S395E mutant of NCoA-1 shows a reduced ability to enhance the STAT6-mediated.

We could show that the recruitment of NCoA-1 to STAT6 is dependent on the phosphorylation state of NCoA-1. New insights into the regulation of coactivator recruitment to STAT6 could contribute to the treatment of STAT6-dependent diseases.



### 3 Einleitung

#### 3.1 Regulation der Genexpression durch Steuerung der Transkription

Die Genexpression kann auf vielen Stufen von der DNA bis zum Protein reguliert werden. Die Transkription stellt einen wichtigen Schritt der differentiellen Genexpression dar und kann durch viele Mechanismen beeinflusst werden. Die Transkription proteinkodierender Gene erfolgt über die RNA-Polymerase II. Die RNA-Polymerase II ist für die Initiation der Transkription von sechs generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) abhängig (Kornberg 2007). Diese bilden durch deren sequentielle Rekrutierung den Präinitiationskomplex (PIC). Die Zusammensetzung des PIC beginnt mit der Bindung des Faktors TFIID (TATA-Box Bindeprotein TBP) an die TATA-Box in der Promotorregion des Gens. Danach erfolgt eine sukzessive Rekrutierung der Faktoren TFIIA, TFIIB, TFIIF mit der RNA-Polymerase II, TFIIIE und TFIIH. Die Faktoren rekrutieren die Polymerase auf den Promotor, wirken stabilisierend auf den Komplex und bewirken das Aufschmelzen der DNA in der Promotorregion. Die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase führt letztlich zu ihrem Übergang aus dem PIC in die Elongationsphase (Kornberg 2007) (Roeder 1996) (Woychik and Hampsey 2002).

Die Regulation der differentiellen Genexpression ist durch die generellen Transkriptionsfaktoren nicht möglich. Hierfür werden spezifische, regulierbare Transkriptionsfaktoren benötigt. Diese sind Proteine, die die Reaktion des Organismus auf äußere Einflüsse und innere Veränderungen vermitteln. So werden z. B. die nukleären Hormonrezeptoren durch die spezifische Bindung von Hormonen oder die STAT Transkriptionsfaktoren durch Interferone, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und regulieren die Transkription ihrer Zielgene.

Neben der spezifischen Rekrutierung der RNA-Polymerase durch Transkriptionsfaktoren sind für die Transkriptionsaktivierung von im Zellkern verpacktem Chromatin Transkriptionskoaktivatoren nötig. Diese machen die verpackte DNA der Transkription zugänglich, rekrutieren weitere Faktoren oder stabilisieren den Transkriptionskomplex. Dabei besitzen die Koaktivatoren unterschiedliche enzymatische Aktivitäten (Han, Lonard et al. 2009), wie z. B. Histonazetyltransferaseaktivität (HAT), die für die Öffnung des Chromatins als Voraussetzung für die Transkription von Bedeutung ist. Die Transkriptionskoaktivatoren können selbst nicht an die DNA binden und werden durch Transkriptionsfaktoren rekrutiert.

Die Assemblierung des Koaktivatorkomplexes ist ein dynamischer Prozess der die transiente Rekrutierung von Koaktivatoren mit teils redundanten Funktionen beinhaltet. Dieser Prozess ermöglicht eine Regulation, die durch posttranslationale Modifikation der Transkriptionsfaktoren oder der Transkriptionskoaktivatoren erreicht wird.

### 3.2 STAT-Proteine (Signal transducer and activator of transcription)

Zur Familie der STAT-Proteine gehören sieben Proteine, die als latente Transkriptionsfaktoren wirken. STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und STAT6. Sie sind an der Immunität, der Organbildung und der Embryonalentwicklung beteiligt (O'Shea, Gadina et al. 2002). STAT1, 2, 4 und STAT6 sind an der Immunabwehr beteiligt, während STAT3 und STAT5 durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die Zellproliferation wirken (Akira 1999). Die Mitglieder der STAT-Familie sind in ihrer Domänenstruktur (Abb. 1) ähnlich aufgebaut (Bromberg and Chen 2001) und werden durch unterschiedliche, teils identische Stimuli aktiviert (Schindler, Levy et al. 2007).

Domänenstruktur STAT Proteine

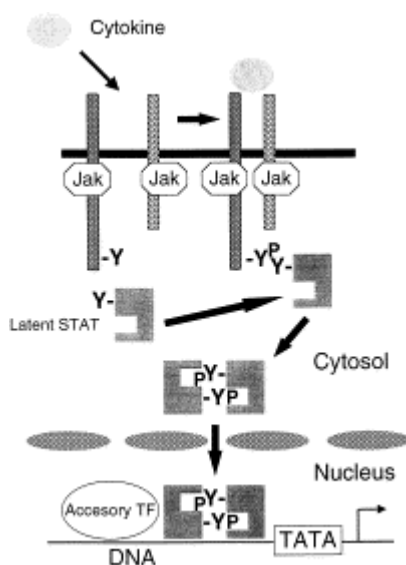


**Abbildung 1: Schematische Übersicht der Domänenstruktur der STAT Proteine.** N-term (N-terminale Domäne), Coiled-coil (Coiled-coil Domäne), DBD (DNA Bindedomäne), linker (linker Domäne), SH2 (SH2 Domäne), TAD (Transaktivierungsdomäne)

Die N-terminale Domäne (NTD) führt zur Tetramerisierung von STAT-Dimeren auf in der DNA benachbarten Bindungselementen, was zur besonders starken Transkriptionsaktivierung von Zielgenen mit entsprechendem Promotoraufbau führt. Auf die NTD folgt die Coiled-coil Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. Über die anschließende DNA Bindungsdomäne (DBD) binden die STAT-Proteine an die ihre Bindungselemente in der DNA. Die klassische STAT Bindestelle ist ein Palindrom, die sogenannte „gamma activated sequence“ (GAS) Konsensussequenz TTC(N<sub>3-4</sub>)GAA, die als Bindestelle für STAT1 nach Interferon Gamma Behandlung identifiziert wurde. Die anschließende Linker Domäne ist wichtig für die Struktur des Proteins. Ihr folgt die SH2 Domäne, die die Bindung an den zytoplasmatischen Teil des aktivierenden Rezeptors und die reziproke Dimerisierung der STATs über phosphorylierte Tyrosinreste ermöglicht. Die Dimerisierung erfolgt über ein direkt C-terminal der SH2-Domäne liegendes Tyrosin, welches von den Rezeptor gebundenen Januskinasen (JAKs) phosphoryliert wird. Die besondere Aufmerksamkeit dieser Arbeit liegt auf der am C-Terminus liegenden Transaktivierungsdomäne (TAD), über die die Rekrutierung von Transkriptionskoaktivatoren erfolgt.

### 3.3 Aktivierung der STAT-Proteine

Die STAT-Proteine werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert, die an unterschiedlichen Rezeptoren binden. Der am besten charakterisierte Signalweg, der zur Aktivierung der STAT-Proteine führt, ist der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Schindler, Levy et al. 2007). Bei diesem bindet ein extrazellulärer Ligand an die extrazelluläre Domäne seines Rezeptors und führt zu dessen Dimerisierung oder Multimerisierung. Hierdurch werden die an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziierten JAKs in räumliche Nähe gebracht, was zu gegenseitiger Phosphorylierung von konservierten Tyrosinresten der JAKs führt. Die aktivierten JAKs phosphorylieren konservierte Tyrosine des Rezeptors, die als Bindestellen der SH2-Domänen der STAT-Proteine dienen (Abb. 2).



**Abb. 2: Aktivierung der STAT Proteine durch extrazelluläre Stimuli.** JAK (Januskinase), pY (Phosphotyrosin), STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). (aus: Imada 2000)

Die an den Rezeptor gebundenen STAT-Proteine können dann durch die JAKs phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosins führt zur Aktivierung und reziproken Dimerisierung der STAT-Proteine über die Bindung des Phosphotyrosins durch die SH2-Domäne des anderen STAT Moleküls. Die Konformationsänderung der STAT Proteine führt zur Translokation in den Zellkern wo sie durch Bindung an Promotoren oder Enhancern die Expression ihrer Zielgene regulieren.

### 3.4 Biologische Funktionen von STAT6

STAT6 vermittelt die zelluläre Signalübertragung der extrazellulären Signale Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006) (Hershey 2003). Diese binden an den IL-4 Rezeptor  $\alpha$ , der als Heterodimer mit der „allgemeinen Gamma-Kette“, oder mit der Alphakette 1 des IL-13 Rezeptors vorliegt. Die Aktivierung von STAT6 kann zelltypspezifisch durch JAK1, JAK2 und JAK3 erfolgen. So konnte neben der

klassischen Aktivierung von STAT6 durch JAK1 und JAK3 die Aktivierung über JAK2 in B-Zellen gezeigt werden (Mottok, Renne et al. 2007). Die STAT6 Zielgene sind hauptsächlich an den Funktionen des Immunsystems beteiligt. Sie kodieren überwiegend Zytokine, Chemokine, Rezeptoren und an der Differenzierung von Lymphocyten beteiligte Gene (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006). Die Rolle von STAT6 bei der humoralen Immunabwehr wurde an STAT6 defizienten Mäusen untersucht (Kaplan, Schindler et al. 1996) (Shimoda, van Deursen et al. 1996) (Takeda, Tanaka et al. 1996). Deren B-Zellen exprimieren weder Immunglobulin Epsilon (IgE) noch Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse II, die die Bindung und Präsentation von Antigenen ermöglichen. Die STAT6-vermittelte Expression des germline (GL) Epsilon Transkripts ist die Voraussetzung für den Antikörperklassenwechsel durch Rekombinationsereignisse hin zum Immunglobulin Epsilon (IgE)-Isotyp. Die Expression von IgE führt zur Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen bei Antigenkontakt, die bei der Bekämpfung parasitären Befalls eine wichtige Funktion haben. (Sutton and Gould 1993) (Corry 2002). T-Zellen aus STAT6 Knockout Mäusen differenzieren nicht zu T helper 2 (Th<sub>2</sub>) Zellen. Th<sub>2</sub>-Zellen steuern die humorale Immunabwehr und ermöglichen die Abwehr extrazellulärer Parasiten. Darüber hinaus führt IL-4 in Mäusen zu einer STAT6 abhängigen Proliferation von Lymphocyten (Kaplan, Schindler et al. 1996). STAT6 kann alternativ durch IL-3, IL-15, Interferon alpha (IFN- $\alpha$ ), Platelet derived growth factor (PDGF) und andere Hormone aktiviert werden (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006). Neben den physiologischen Funktionen ist STAT6 auch an der Ausbildung von Krankheiten wie Allergien, Asthma und dem Hodgkin-Lymphom beteiligt (Chatila 2004) (Brombacher 2000) (Baus, Nonnenmacher et al. 2009).

### 3.5 Phosphorylierung der STATs

Neben der Tyrosinphosphorylierung wurden in unabhängigen Studien Threonin- und überwiegend Serinphosphorylierungen in den Transaktivierungsdomänen der STATs gefunden. Die Transkriptionsaktivierung durch STAT1 und STAT3 ist direkt abhängig von der Phosphorylierung am Serin 727 durch unterschiedliche Stimuli (Pilz, Ramsauer et al. 2003) (Schuringa, Schepers et al. 2001). Die STAT1 phosphorylierende Kinase konnte allerdings nicht identifiziert werden (Decker and Kovarik 2000). Dieses Serin liegt in einem Prolin-Methionin-Serin-Prolin (PMSP)-Motiv, das in STAT1, STAT3, STAT4 und STAT5 (in STAT5 Prolin-Methionin-Prolin-Motiv) konserviert ist. Die Transkriptionsaktivierung über STAT5 oder STAT6 ist hingegen nicht abhängig von der Phosphorylierung dieses konservierten Serins (Yamashita, Xu et al. 1998) (Wang, Malabarba et al. 2004).

In Zentrum der Untersuchung der Serinphosphorylierung steht der Zusammenhang mit der Aktivierung des konservierten Tyrosin und die STAT DNA-Bindung. Während die Serinphosphorylierung von STAT3 die Dimerisierung und DNA-Bindung verstärkt (Zhang, Blenis et al. 1995), konnte für STAT5 und STAT6 kein Einfluß der induzierten

Serinphosphorylierung auf die Aktivierung oder DNA-Bindung festgestellt werden (Yamashita, Xu et al. 1998) (Pesu, Takaluoma et al. 2000). Eine Abhängigkeit der Koaktivatorrekrutierung von der Phosphorylierung der TAD wurde bislang nur bei STAT3 gezeigt. Phosphoryliertes Serin 726 führt zu verstärkter Rekrutierung von p300/CBP an STAT3 und somit zu verstärkter Transkription (Schuringa, Schepers et al. 2001).

Die Funktion der Serin-/Threoninphosphorylierung der TAD von STAT6 ist bislang nicht eindeutig geklärt. STAT6 wird in B Zellen durch IL-4 Stimulation in der TAD serinphosphoryliert (Pesu, Aittomaki et al. 2002) (Wick and Berton 2000). Es konnte gezeigt werden, daß speziell die Region der Aminosäuren (AS) 719-798 und deren angrenzende Bereiche, die auch die Interaktionsstelle für den für STAT6 wichtigen Transkriptionskoaktivator NCoA-1 beinhalten, Serin- und Threoninphosphoryliert wird (Wick and Berton 2000). In einer weiteren Studie konnte das Serin 756 als das am stärksten phosphorylierte Serin identifiziert werden (Wang, Malabarba et al. 2004). Obwohl die Serinphosphorylierung von STAT6 durch IL-4 induziert wird, konnte eine Phosphorylierung von STAT6 durch Kinasen Interleukin-4 aktivierter Singalwege nicht gezeigt werden (Woetmann, Brockdorff et al. 2003) (Pesu, Aittomaki et al. 2002).

Obwohl überwiegend die Transaktivierungsdomänen der STAT Proteine phosphoryliert werden und diese die Koaktivatoren rekrutieren, wurde die phosphorylierungsregulierte Koaktivatorrekrutierung bislang nur für STAT3 gezeigt.

### **3.6 Transkriptionskoaktivatoren von STAT6**

Transkriptionskoaktivatoren werden über die Transaktivierungsdomäne von STAT6 rekrutiert. Mehrere Koaktivatoren von STAT6 sind bereits identifiziert und ihre Interaktion mit STAT6, sowie deren Beitrag zur STAT6 getriebenen Transkription bestätigt. Transient exprimiertes STAT6 ohne Transaktivierungsdomäne wirkt dominant-negativ, da die Rekrutierung von Koaktivatoren trotz DNA-Bindung von STAT6 nicht möglich ist (Lu, Reichel et al. 1997).

p300/CREB Binding Protein (CBP) sind Transkriptionskoaktivatoren von STAT6. Sie sind zwei unterschiedliche Proteine ähnlichen Aufbaus und redundanter Funktion und werden nachfolgend als CBP benannt. CBP ist eine Histonazetyltransferase (Bannister and Kouzarides 1996) und konnte neben der Aktivierung der Genexpression über die nukleären Hormonrezeptoren auch als Koaktivator von STAT6 identifiziert werden (Gingras, Simard et al. 1999).

CBP bindet über die Aminosäuren 1850-2176 an die Transaktivierungsdomäne von STAT6 im Bereich 677-791 (Litterst and Pfizner 2001). Eine genauere Eingrenzung der Region in STAT6 konnte durch die Mutagenese einzelner Aminosäuren im Bereich um AS 780 erreicht werden, die aber nicht in Protein-Protein Interaktionsstudien charakterisiert werden konnte (McDonald and Reich 1999).

P100 konnte ebenfalls als Koaktivator von STAT6 identifiziert werden. Die Funktion von P100 liegt als Brückenfaktor in der Rekrutierung der Histonazetyltransferaseaktivität von CBP an STAT6 (Valineva, Yang et al. 2005). Neben der Rekrutierung von CBP an STAT6 ist P100 auch als Brückenfaktor zur RNA Polymerase II von Bedeutung (Yang, Aittomaki et al. 2002).

Der Transkriptionskoaktivator NCoA-1 ist für diese Arbeit von zentraler Bedeutung. NCoA-1 bindet als wichtiger Transkriptionskoaktivator mit seiner Per-Arnt-Sim (PAS) B Domäne direkt an den C-terminalen Teil der Transaktivierungsdomäne von STAT6. In Reportergenexperimenten konnte der Beitrag von NCoA-1 an der Transkription über STAT6 bestätigt werden (Litterst and Pfitzner 2001). Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß NCoA-1 an ein LXXLL-Motiv (L steht für Leucin, X steht für eine beliebige Aminosäure) in der TAD von STAT6 bindet (Litterst and Pfitzner 2002). Dieses Motiv ist auch bei der Interaktion der NCoA Proteine mit den nukleären Hormonrezeptoren von Bedeutung (Heery, Kalkhoven et al. 1997). Mit Hilfe der Kristallstruktur von Peptiden von STAT6 und NCoA-1 konnten jeweils die interagierenden Minimalbereiche der Bindungspartner eingegrenzt werden (Razeto, Ramakrishnan et al. 2004). Durch eine Erweiterung des Bereichs von STAT6 konnte allerdings eine erhöhte Stabilität der Interaktion erreicht werden (Seitz, Maillard et al. 2008). Neben der Charakterisierung von NCoA-1 als Koaktivator von STAT6 in Reportergenexperimenten (Litterst and Pfitzner 2001), konnte auch eine NCoA-1 abhängige Expression von CD23, einem endogenen Zielgen von STAT6 in Lymphoblasten gezeigt werden (Goenka, Marlar et al. 2003). Abgesehen von NCoA-1 wurde auch NCoA-3 als Koaktivator von STAT6 identifiziert. NCoA-3 wird durch IL-4 Stimulation STAT6-abhängig auf Proteinebene stärker exprimiert und führt zu erhöhter STAT6 vermittelter Transkription. NCoA-3 wird durch CBP an STAT6 rekrutiert und bindet nicht direkt an STAT6 (Arimura, vn Peer et al. 2004).

### **3.7 Die Familie der NCoA-Koaktivatoren**

Die Familie der NCoA Proteine umfasst drei Mitglieder: NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3. Diese Transkriptionskoaktivatoren, von denen NCoA-1 und NCoA-3 schwache intrinsische Histonazetyltransferaseaktivität (HAT) besitzen (Spencer, Jenster et al. 1997) (Chen, Lin et al. 1997), wurden als Koaktivatoren der nukleären Hormonrezeptoren identifiziert (Xu and O'Malley 2002) (Xu and Li 2003). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung an der Transkriptionsaktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren, z. B. STAT3 (Zhao, Nakajima et al. 2004) STAT5 (Litterst, Kliem et al. 2003) STAT6 (Litterst and Pfitzner 2001) (Goenka, Marlar et al. 2003), AP1 und NF- $\kappa$ B gezeigt werden (Lee, Kim et al. 1998) (Na, Lee et al. 1998).

Die NCoA Koaktivatoren sind homologe Proteine mit einer Größe von 160 kDa. Der strukturelle Aufbau der NCoAs ist zwischen den Mitgliedern der Familie konserviert und besteht aus den gleichen Domänen (Abb. 3):

## Domänenstruktur NCoA Proteine

bHLH	PAS	NID	AD1/CID	Q-reich	AD2
------	-----	-----	---------	---------	-----

**Abb.3 :Schematische Übersicht der Domänenstruktur der NCoA Proteine.** bHLH (basic Helix-Loop-Helix), PAS (Per- Arnt- Sim), NID (Interaktionsdomäne mit nukleären Hormonrezeptoren), AD1/CID (Aktivierungsdomäne 1, CBP Interaktionsdomäne), Q-reich (gkutaminreich), AD2(Aktivierungsdomäne 2)

Der N-terminal gelegene Bereich der bHLH/PAS Domänen weist die höchste Konservierung zwischen den Familienmitgliedern auf. bHLH (basic Helix-loop-helix) Motive sind DNA-Bindedomänen, die die Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren und deren DNA-Bindung vermitteln. Trotz des Vorhandenseins dieser Domäne in den NCoAs konnte keine direkte DNA-Bindung dieser Koaktivatoren festgestellt werden.

Die Region der PAS Domäne (Per/ARNT/Sim) beinhaltet zwei PAS Domänen, PAS A und PAS B. Während die PAS B Domäne von NCoA-1 zunächst als Interaktionsdomäne an STAT6 identifiziert wurde (Razeto, Ramakrishnan et al. 2004), konnte gezeigt werden, daß der Bereich der PAS Domäne von NCoA-1 auch die Transkriptionsaktivierung am Thyroidhormonrezeptor, Östrogenrezeptor und dem Progesteronrezeptor verstärkt (Liu, Wong et al. 2001) (Privalsky, Lee et al. 2009). Darüber hinaus vermittelt die PAS B Domäne die Interaktion von NCoA-Proteinen untereinander über die C-terminal gelegene AD1 Domäne der NCoA-Proteine (Lodrini, Munz et al. 2008).

An die PAS Domäne schließt sich die Nuclear-Receptor-Interaction Domäne (NID) an. Diese Domäne interagiert direkt mit den nukleären Hormonrezeptoren, sofern diese aktivierenden Ligand gebunden haben. Die NID beinhaltet drei LXXLL-Motive, die die Interaktion mit den nukleären Hormonrezeptoren vermitteln (Heery, Kalkhoven et al. 1997) (Privalsky, Lee et al. 2009). Die Interaktionsoberfläche der nukleären Hormonrezeptoren besteht aus einer hydrophoben Furche aus Teilen mehrerer Helices. Eine besondere Bedeutung kommt der Helix 12 zu, die durch die Ligandenbindung umpositioniert wird und somit die ligandenabhängige Koaktivatorrekrutierung reguliert [Feng, 1998].

C-terminal der NID liegen zwei Transaktivierungsdomänen, AD1 und AD2. Während über die AD2-Region die Histon-Methyltransferasen CARM1 und PRMT1 rekrutiert werden (Chen, Ma et al. 1999) (Koh, Chen et al. 2001), interagiert die AD1 über LXXLL ähnliche Motive mit CBP (Torchia, Rose et al. 1997) (Kalkhoven, Valentine et al. 1998) (Voegel, Heine et al. 1998). Die Interaktion zwischen den NCoA-Proteinen und CBP und die damit verbundene Korekrutierung an die nukleären Hormonrezeptoren sind Voraussetzung einer maximalen Transkriptionsaktivierung am jeweiligen nukleären Hormonrezeptor (Voegel, Heine et al. 1998) (Liu, Wong et al. 2001) (Sheppard, Harries et al. 2001) (Smith, Onate et al. 1996) (Torchia, Rose et al. 1997). Obwohl NCoA-1 und CBP Transkriptionskoaktivatoren für

STAT6 sind und an verschiedene Bereiche binden, konnte eine Korekrutierung für STAT6 bislang nicht gezeigt werden.

Für die HAT-aktivität der NCoA Proteine konnte bislang keine wichtige Funktion bei der Transkriptionsaktivierung gezeigt werden. Eine wichtige Funktion der NCoA Proteine besteht in der Rekrutierung weiterer Chromatin modifizierender Transkriptionskoaktivatoren wie HATs und Histonmethyltransferasen. Darüber hinaus vermittelt NCoA-1 den Kontakt des Transkriptionsfaktor/-koaktivator Komplexes mit der basalen Transkriptionsmaschinerie über TBP und TFIIB (Takeshita, Yen et al. 1996) und zur RNA Pol II. Die NCoA Proteine werden in vielen Geweben exprimiert (Xu and Li 2003) und können ihre Funktionen gegenseitig nach Ausschaltung eines Familienmitgliedes durch erhöhte Expression eines anderen Familienmitglieds ausgleichen (Apostolakis, Ramamurphy et al. 2002) (Xu, Qiu et al. 1998) (Wang, Lu et al. 2001). Studien an Doppelknockoutmäusen zweier NCoA Proteine führen allerdings zu letalen Störungen und kompletter Unfruchtbarkeit (Xu, Wu et al. 2009). Die unterschiedlichen NCoA Proteine wurden jeweils mehrfach unabhängig voneinander identifiziert und erst später einer Familie zugeordnet. Diese wurde als die Familie der NCoA (nuklear receptor coactivator) Proteine benannt.

### **3.8 Die physiologischen Funktionen der NCoA Proteine**

#### **3.8.1 NCoA-1**

NCoA-1 wurde als erstes der drei NCoA Proteine als wichtiger Koaktivator an verschiedenen Steroidhormonrezeptoren identifiziert und wurde als Steroid receptor coactivator (SRC-1) benannt (Onate, Tsai et al. 1995). NCoA-1 Knockout Mäuse zeigen eine partielle Hormonresistenz, die zur Hemmung des Wachstums und der Differenzierung von Zielorganen der Steroidhormone wie z. B. der Prostata oder des Uterus führt (Xu, Qiu et al. 1998). NCoA-1 Knockout-Mäuse sind daher in ihrer Fertilität eingeschränkt.

#### **3.8.2 NCoA-2**

NCoA-2 wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig als Koaktivator von nukleären Hormonrezeptoren identifiziert und TIF2 (transcriptional intermediary factor 2) (Voegel, Heine et al. 1996) und GRIP1 (Glucocorticoid receptor-interacting protein 1) (Hong, Kohli et al. 1996) benannt. NCoA-2 ist für die Ausbildung von Reproduktionsorganen essentiell. So ist die Ausbildung des Uterus, sowie des Brustdrüsengewebes (Mukherjee, Soyal et al. 2006) und die Spermatogenese von NCoA-2 abhängig.

#### **3.8.3 NCoA-3**

NCoA-3 wurde unabhängig von mehreren Arbeitsgruppen als p/CIP (p300/CBP/cointegrator-associated protein) (Torchia, Rose et al. 1997), RAC3 (Receptor-associated coactivator 3 (Li, Gomes et al. 1997), ACTR (Activator of thyroid and retinoic acid receptors) (Chen, Lin et al.



1997), AIB1 (amplified in breast cancer) (Anzick, Kononen et al. 1997) und TRAM-1 (Thyroid hormone receptor activator molecule-1) (Takeshita, Cardona et al. 1997) identifiziert.

NCoA-3 spielt eine wichtige Rolle bei der entwicklungsbedingten Zellteilung von der Embryogenese bis zum adulten Tier und ist wichtiger Faktor für die Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane und des Brustdrüsengewebes (Xu, Liao et al. 2000).

Neben den physiologischen Funktionen der NCoA Proteine wurde eine Rolle der NCoA Koaktivatoren bei der Entwicklung von pathologischen Veränderungen gefunden. Besonders die Expressionslevel der NCoA Koaktivatoren bei verschiedenen Krebsarten sind hierbei von zentralem Interesse. So konnte gezeigt werden, dass NCoA-1 und vor allem NCoA-3 bei Brustkrebs überexprimiert vorliegen und zur Östrogen induzierten Proliferation beitragen (Xu, Wu et al. 2009).

### **3.9 Posttranslationale Modifikationen der NCoAs**

Transkriptionsfaktoren können um eine limitierende Menge an Transkriptionskoaktivatoren kompetieren und somit gegenseitig die Transkription beschränken (Meyer, Gronemeyer et al. 1989). Ein Beispiel hierfür ist CBP, das in limitierenden Mengen vorliegen kann (Kamei, Xu et al. 1996). Spezifische posttranslationale Modifikationen können die Selektivität von Koaktivatoren für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Durch die selektive Modifikation eines Transkriptionskoaktivators kann die Rekrutierung an einen spezifischen Transkriptionsfaktor verstärkt werden. Signal gesteuerte posttranslationale Modifikationen eröffnen somit auch die Möglichkeit der Signalintegration verschiedener zellulärer Signalwege (Wu, Qin et al. 2004).

Als posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung von zentralem Interesse bei der Untersuchung der Regulation zellulärer Vorgänge. Für die Regulation der Transkription durch Phosphorylierung gibt es bereits viele Beispiele. Dabei kann sowohl der Transkriptionsfaktor meist in oder in der Nähe der Koaktivatoren rekrutierenden TAD (Sharrocks, Yang et al. 2000), als auch der Transkriptionskoaktivator Stimulus abhängig phosphoryliert werden (Han, Lonard et al. 2009) (Li and Shang 2007).

Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit sind die NCoA Transkriptionskoaktivatoren, deren Rekrutierung an verschiedene Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierungen reguliert werden kann (Xu, Wu et al. 2009) (Li and Shang 2007). Dabei wirkt die Modifikation meist zu verstärkter Rekrutierung und Transkriptionsaktivierung durch den modifizierten Koaktivator (Wu, Qin et al. 2004).

Die Untersuchung des Einflusses posttranslationaler Modifikationen wurde meist in Reportergenuntersuchungen in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht, die den Bedingungen der Zellen, in denen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren wirken, nicht identisch sind. Als durch Transfektion gut manipulierbare Modellsysteme konnten sie dennoch erheblich zum Verständnis der Regulation der Koaktivatorrekrutierung beitragen.

So sind für NCoA-1 bislang sieben Phosphorylierungsstellen bekannt (Ser-372, Ser-395, Ser-517, Ser- 569, Ser-1033, Thr-1179 und Ser-1185), die in Konsensussequenzen für prolin-geführte Proteinkinasen liegen (Rowan, Weigel et al. 2000). Die Phosphorylierungen der Aminosäuren Thr-1179 und Ser-1185 durch MAP Kinasen in NCoA-1 führen zu einer Ligand abhängigen und unabhängigen Erhöhung der Transkription am Progesteronrezeptor (Rowan, Garrison et al. 2000).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cdk2 NCoA-1 phosphoryliert und dies die Transkription am Progesteronrezeptor verstärkt (Narayanan, Adigun et al. 2005). Die in NCoA-1 phosphorylierten Aminosäuren wurde aber im Rahmen der betreffenden Arbeit nicht identifiziert. Ein weiteres Beispiel ist die MAP Kinase vermittelte Phosphorylierung von NCoA-1, die zu einer erhöhten Transkription am Androgenrezeptor führt. Die Transkriptionsaktivierung ist unabhängig von der Androgenstimulation. NCoA-1 bindet in diesem Fall an eine alternative Region im Androgenrezeptor nach Aktivierung der MAP Kinase durch Interleukin-6 Stimulation (Ueda, Mawji et al. 2002). In ähnlicher Weise bindet NCoA-1 ohne Östrogenstimulation an den N-Terminus des Östrogenrezeptors und aktiviert die Transkription (Dutertre and Smith 2003). Durch diese Beispiele wird die Gewichtung posttranslationaler Modifikationen der Koaktivatoren für die Transkriptionsaktivierung deutlich, die sogar die Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch das Hormon entbehrlich macht. Auch die Möglichkeit der Integration von zellulären Signalwegen durch die Modifikation von Transkriptionsfaktor und Transkriptionskoaktivator wird an diesen Beispielen deutlich.

Ebenso konnte für die Modifikation von NCoA-1 durch Sumoylierung ein Einfluß auf die Aktivierung der Genexpression gezeigt werden. Die Sumoylierung von NCoA-1 verstärkt die Transkriptionsaktivierung durch den Progesteronrezeptor und den Östrogenrezeptor vermutlich durch die verstärkte Akkumulation des sumoylierten NCoA-1 im Zellkern (Chauchereau, Amazit et al. 2003). Eine Zusammenhang zwischen induzierter Phosphorylierung und anschließender Sumoylierung konnte aber bislang für NCoA-1 nicht gezeigt werden (Li and Shang 2007).

Die posttranslationalen Modifikationen von NCoA-2 wurden bislang nicht so intensiv untersucht. In einem Beispiel wird NCoA-2 durch die cAMP abhängige Protein Kinase phosphoryliert, was zu seinem proteasomalen Abbau und damit zu einer verringerten Transkriptionsaktivierung am Glucocorticoidrezeptor führt (Hoang, Fenne et al. 2004).

Da NCoA-3 ein wichtiger Transkriptionskoaktivator im Zusammenhang mit Brustkrebs ist, wurde der Einfluß posttranslationaler Modifikationen auf NCoA-3 besonders intensiv untersucht. Neben der Rolle für die Transkriptionsaktivierung, wurde der Einfluß von Modifikationen wie Phosphorylierung und Methylierung auf die Stabilität von NCoA-3 untersucht (Naeem, Cheng et al. 2007) (Li, Liang et al. 2008). NCoA-3 wird durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert (Han, Lonard et al. 2009) (Li and Shang 2007). Auch für NCoA-3 konnte eine spezifische Aktivierung der Transkription am Östrogenrezeptor,

am Androgenrezeptor und an NF- $\kappa$ B durch Phosphorylierung an sechs Aminosäuren gezeigt werden (Wu, Qin et al. 2004). Durch Phosphorylierungen verändert sich die Stabilität von NCoA-3 und beeinflusst die Transkriptionsaktivierung am Östrogenrezeptor und am Androgenrezeptor (Wu, Feng et al. 2007). Es kommt zu einer phosphorylierungsabhängigen Akkumulation von Ubiquitin und schließlich zum Abbau von NCoA-3. In neueren Studien konnte auch eine Funktion zellulärer Serin-/ Threoninphosphatasen auf die Stabilität von NCoA-3 gezeigt werden (Li, Liang et al. 2008). Die Regulation der Transkription durch Phosphatasen ist sehr wichtig, aber bislang nicht intensiv untersucht, vermutlich weil die Regulation der Phosphatkomplexe und die Substratspezifität von Phosphatasen im Gegensatz zu Kinasen geringer ist.

### **3.10 PP2A**

#### **3.10.1 Physiologische Funktionen**

PP2A wurde durch die Bindung an das mittlere T Antigen des SV40 Viruses identifiziert (Grussenmeyer, Carbone-Wiley et al. 1987) und später als Phosphatase charakterisiert. PP2A gehört zur Klasse der Protein Serin-/ Threoninphosphatasen, die sich in 3 Hauptfamilien einteilen: Phosphoproteinphosphatasen, metallabhängige Proteinphosphatasen und Asparaginsäurebasierte Phosphatasen. PP2A gehört neben PP1, PP2B, PP4, PP5, PP6 und PP7 zur Familie der Phosphoproteinphosphatasen. Der strukturelle Aufbau der katalytischen Zentren von PP1 und PP2A ist sehr ähnlich. Die Dephosphorylierungsreaktion durch PP2A im katalytischen Zentrum des Enzyms wird durch gebundene Manganionen ermöglicht.

PP2A spielt bei der Entwicklung, bei der Zellproliferation, sowie dem programmierten Zelltod, der Dynamik des Zytoskeletts und der Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle (Shi 2009). Als Regulator zellulärer Signalwege ist PP2A ein Tumorsuppressor (Janssens, Goris et al. 2005) und Zielstruktur viraler Transformation durch das SV40 Virus, dessen Proteine die Zusammensetzung eines funktionellen Holoenzymkomplexes von PP2A verhindern (Westermarck and Hahn 2008). Inhibitoren für die katalytische Aktivität von PP2A wie Okadasäure und Calyculin A werden daher auch als Tumorpromotoren bezeichnet.

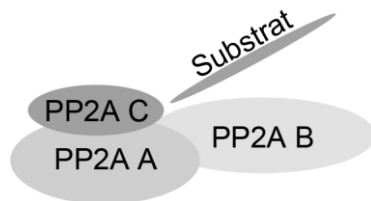
#### **3.10.2 Der molekulare Aufbau von PP2A**

PP2A ist ein Sammelbegriff für viele Phosphatasen gleicher Enzymaktivität. Von der in der Evolution hoch konservierten (Cohen, Brewis et al. 1990) katalytischen Untereinheit PP2A C mit einer Masse von 37 kDa existieren zwei Isoformen, die zu 97% sequenzidentisch sind. Die Phosphataseaktivität von PP2A (und PP1) kann durch Okadasäure oder Calyculin A inhibiert werden, die durch die konjugierte Base einer Karbonsäuregruppe anstatt einer Phosphatgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms binden. Über ein hydrophobes Ende der Inhibitoren, das strukturell einem Teil eines Substrates von PP2A und PP1 ähnelt, werden

die Inhibitoren gebunden und am katalytischen Zentrum gehalten (Gauss, Sheppeck et al. 1997).

Die katalytische Untereinheit assembliert mit der strukturegebenden Untereinheit PP2A A (PR65) mit einer Masse von 65 kDa, von der es ebenfalls zwei Isoformen gibt. Diese sind zu 86% sequenzidentisch und aus 15 Sequenzwiederholungen, den sog. HEAT (Huntington/A-subunit/TOR) Sequenzen aufgebaut. PP2A C bindet an PP2A A über die Sequenzwiederholungen 11 bis 15 an PP2A A (Ruediger, Roeckel et al. 1992).

### PP2A Komplex



**Abb. 4: Zusammensetzung des PP2A Holoenzymkomplexes.** PP2A C (katalytische Untereinheit), PP2A A (Assemblierungs-untereinheit), PP2A B (regulatorische Untereinheit)

Die regulatorischen Untereinheiten PP2A B, die die Substratspezifität vermitteln (Eichhorn, Creighton et al. 2009), binden an die katalytische Untereinheit PP2A C typspezifisch direkt oder indirekt durch Bindung an PP2A A. Der assemblierte Komplex aus PP2A C mit PP2A A und PP2A B wird als Holoenzym bezeichnet und ist die Voraussetzung für die gerichtete enzymatische Aktivität. Von den regulatorischen Untereinheiten PP2A B existieren vier Familien mit je zwei bis fünf Isoformen, die für Proteine von 53 bis 130 kDa kodieren (Shi 2009). Zusätzlich zu diesen Genen der B Untereinheiten existieren alternative Transkripte und Splicevarianten, wodurch die Diversität weiter erhöht wird. Abgesehen von wenigen Aminosäuren mit denen die B-Untereinheiten an die N-terminalen HEAT Sequenzwiederholungen von PP2A A binden, weisen die Familien untereinander keinerlei Sequenzähnlichkeiten auf (Janssens and Goris 2001). Neben der Vermittlung der Substratspezifität des Holoenzymkomplexes spielen die regulatorischen Untereinheiten, die in der Zelle unterschiedlich verteilt sind (Gigena, Ito et al. 2005), auch eine Rolle bei der Lokalisation der katalytischen Untereinheit von PP2A.

### 3.10.3 Die Regulation von PP2A

PP2A ist an vielen Dephosphorylierungsereignissen in der Zelle beteiligt. Übereinstimmend mit der großen Zahl an Substraten gibt es viele Möglichkeiten für die Regulation von PP2A. Der Hauptregulationemechanismus erfolgt über die Substratspezifität durch Assemblierung unterschiedlicher Holoenzymkomplexe mit verschiedenen B Untereinheiten. Die Rekrutierung von regulatorischen Untereinheiten durch den PP2A C/ PP2A A Komplex wird durch die Modifikation des C-Terminus von PP2A C reguliert. Die Methylierung, sowie die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren von PP2A C führt zu spezifisch veränderter Affinität der

katalytischen Untereinheit mit unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten (Longin, Zwaenepoel et al. 2007).

Die Modifikation der regulatorischen Untereinheiten und der katalytischen Untereinheit kann somit durch die veränderte Affinität zu den regulatorischen Untereinheiten die zelluläre Verteilung von PP2A C beeinflussen. Da die regulatorischen Untereinheiten unterschiedlich in der Zelle verteilt sind, kann von einer induzierten, modifikationsabhängigen subzellulären Umverteilung des PP2A Kernkomplexes aus PP2A A und PP2A C ausgegangen werden. So könnte der kompartimentspezifische Methylierungszustand zwischen Zellkern und Zytosol von PP2A C (Longin, Zwaenepoel et al. 2008) durch die veränderte Affinität zu unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten bedingt sein.

Eine Regulation von PP2A durch IL-4 Signaltransduktion ist über die Phosphorylierung des C-terminalen Teils von PP2A C möglich. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit wird durch Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen reguliert (Chen, Martin et al. 1992). PP2A wird durch JAK2 Stimulus spezifisch phosphoryliert, wodurch die Aktivierung von STAT5 nach Interleukin-3 Stimulation verstärkt wird (Yokoyama, Reich et al. 2001). Da STAT6 in B-Zellen durch aktiviertes JAK2 tyrosinphosphoryliert werden kann, wäre auch eine Regulation von PP2A durch IL-4 Signaltransduktion prinzipiell möglich. Dies konnte bislang aber nicht gezeigt werden.

### **3.11 Zellzyklusabhängige Transkriptionsregulation**

Neben der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors können auch Transkriptionskoaktivatoren durch den aktivierenden Stimulus modifiziert werden. Parallel zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors wurden Stimulus abhängig in mehreren Studien an den nukleären Hormonrezeptoren Phosphorylierungen an den NCoA Proteinen gefunden. Daneben konnte eine Phosphorylierung von NCoA-1 durch die zellzyklusabhängige Kinase Cdk2 gezeigt werden, die zur Verstärkung der Transkription am Progesteronrezeptor führt (Narayanan, Adigun et al. 2005). Eine auf die Transkription hemmende Wirkung von Cdk2 durch die Phosphorylierung von CBP konnte dagegen am Östrogenrezeptor nachgewiesen werden. Hier wird die HAT Aktivität und die Bindung von CBP an den Östrogenrezeptor inhibiert, während die Rekrutierung von NCoA-1 an den Östrogenrezeptor in diesem Fall nicht Cdk2 abhängig verändert wird (Redeuilh, Attia et al. 2002).

In weiteren Studien konnte eine aktivierende Wirkung von Cyclin D1 auf die Östrogenrezeptor vermittelte Transkription unabhängig von den durch Cyclin D1 aktivierten zellzyklusabhängigen Kinasen gezeigt werden (Zwijsen, Wientjens et al. 1997). Cyclin D1 rekrutiert NCoA-1 an den Östrogenrezeptor und führt dadurch Stimulus unabhängig zur Transkriptionsaktivierung (Zwijsen, Buckle et al. 1998).

Auch für die STAT Proteine wurde bereits der Einfluß von Komponenten der Zellzyklusregulation auf die Transkriptionsaktivierung gefunden. Cyclin D1 bindet an STAT3

und inhibiert die Rekrutierung von CBP und der RNA Polymerase II, wohingegen die Rekrutierung von NCoA-1 an STAT3 nicht durch Cyclin D1 reguliert wird (Bienvenu, Barre et al. 2005). Für STAT aus *Drosophila* konnte eine Aktivierung der Transkription durch Cdk4 unabhängig von der JAK abhängigen STAT Aktivierung induziert werden, die nicht auf eine Cdk4 induzierte STAT Phosphorylierung zurückzuführen ist (Silver and Montell 2003). Da STAT Proteine in *Drosophila* auch unstimuliert an die DNA binden können, könnte die Cdk4 induzierte Transkriptionsaktivierung in einer veränderten Koaktivatorrekrutierung begründet sein.

Ob die Transkription durch die veränderte Koaktivatorrekrutierung speziell in bestimmten Zellzyklusphasen verändert wird, wurde bislang nicht nachgewiesen. Zur Untersuchung der Zellzyklus regulierten Transkription wurde jeweils lediglich der Beitrag der beteiligten Zellzyklus abhängigen Kinasen und Cyclin D1 nachgewiesen.

Ob die Transkriptionsaktivierung durch einen einzelnen Transkriptionsfaktor in bestimmten Phasen des Zellzyklus reguliert wird und welche Funktion diese Regulation hat, wurde aber bislang weder für die nukleären Hormonrezeptoren noch für die STAT Proteine untersucht.

## 4 Zielsetzung

Die Transkriptionsaktivierung durch STAT6 bedarf der Rekrutierung von Koaktivatoren, die chromatinmodifizierende Funktionen übernehmen und den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen. Die Koaktivatorrekrutierung ist ein dynamischer Prozess, der einen starken Einfluß auf das Transkriptionsaktivierungspotential eines Transkriptionsfaktors hat. Folglich muss dieser Prozess einer Regulation unterliegen, die über die Modulation der Transkriptionsaktivierung hinaus auch die Integration unterschiedlicher zellulärer Signalwege ermöglicht. Mehrere Kinasesignalwege und PP2A sind an der Transkriptionsaktivierung durch STAT6 beteiligt, dessen Transkriptionsaktivierungsdomäne phosphoryliert wird. Neben der Modifikation von STAT6 wurden ebenso Modifikationen der Transkriptionskoaktivatoren von STAT6 beschrieben. Besonders die Familie der NCoA Koaktivatoren, von denen NCoA-1 als Koaktivator für STAT6 durch unsrere Gruppe identifiziert wurde, wird durch Phosphorylierungen reguliert.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Rekrutierung der identifizierten Koaktivatoren von STAT6 durch die IL-4 induzierte Serinphosphorylierung von STAT6 reguliert wird. Darüber hinaus soll der Einfluß von Kinasen und Phosphatasen auf die Koaktivatorrekrutierung untersucht werden, die an der STAT6 vermittelten Transkription beteiligt sind. Von besonderem Interesse ist hierbei die Phosphorylierungs abhängige Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6.

Die NCoA Koaktivatoren können durch Phosphorylierungen in ihrer Spezifität für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Es soll untersucht werden, ob die Phosphorylierung von NCoA-1 durch die an der STAT6 vermittelten Transkription beteiligten Kinasen und Phosphatasen reguliert wird. Zur Untersuchung der phosphorylierungs abhängigen Transkriptionsfaktorspezifität soll der Einfluß der Phosphorylierung zwischen STAT6 und dem Östrogenrezeptor verglichen werden. Eine Abhängigkeit der Rekrutierung von NCoA-1 an den Östrogenrezeptor durch Phosphorylierung wurde bereits in der Literatur beschrieben.

Unterschiedliche Arbeiten zeigen, daß NCoA-1 in verschiedenen Domänen phosphoryliert wird. Es soll daher untersucht werden, in welchen Bereichen und welche Aminosäuren von NCoA-1 phosphoryliert werden und welchen Einfluß dies auf die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 hat.

In Reportergenexperimenten und durch die Analyse der Expression endogener Zielgene von STAT6 soll der Einfluß der regulierten Koaktivatorrekrutierung an STAT6 im physiologischen Kontext charakterisiert werden.

Es soll untersucht werden, welcher Mechanismus die Koaktivatorrekrutierung an STAT6 reguliert. Dabei sollen die beteiligten regulatorischen Proteine identifiziert, sowie der molekulare Mechanismus der Regulation der STAT6/ Koaktivatorkomplex Interaktion charakterisiert werden.



## 5 Material:

### 5.1 Kits und Größenstandardmarker

Produkt	Hersteller / Firma
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Größenstandard, 1 Kb Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Absolute SYBR Green Fluorescein	Thermo Scientific, Rockford (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 5.2 Enzyme

Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) wurden im mitgelieferten Puffer unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet.

Enzym	Hersteller
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen
Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

### 5.3 Antikörper

Name / Antigen	Hersteller	Spezies	Verw. /Menge, Verd., Konz.
STAT6 (M200)	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen	IP 2-4 µg
STAT6 (M20)	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen	IP 2-4 µg
Pol II CTD4H8	Upstate, Lake Placid (USA)	Maus	WB 1:3000
SRC-1 (1135/H4)	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	WB 1:2000
SRC-1 (M341)	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen	IP 2-4 µg
SRC-2 OBT1796	ABD Serotec, Düsseldorf	Kaninchen	WB 1:2000
p/CIP (M-3897)	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen	IP 2-4 µg, WB 1:1000
Pol II (N-20)	Santa Cruz, Heidelberg	Kaninchen	WB 1:1000
Phospho-STAT6	Cell Signaling, Beverley	Kaninchen	WB 1:1000
STAT6	Transd. Lab., Heidelberg	Maus	WB 1:1000
Tubulin	Sigma, Taufkirchen	Maus	WB 1:50000
L.C. Full length GFP	Clontech, Heidelberg	Maus	IP 1-4 µg
c-Myc	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	IP 1-4 µg
Myc-Tag (9B11)	Cell Signaling, Beverley (USA)	Maus	WB 1:5000
PP2A clone 1D6	Upstate, Lake Placid USA	Maus	IP 1-4 µg, WB 1:5000
mSIN3A	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	WB 1:3000
GFP (B-2)	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	WB 1:3000

Für Immunpräzipitationen und Koimmunpräzipitationen wurden die spezifischen Antikörper an Proteinagarosebeads der Firma Santa Cruz, Heidelberg gebunden.

Für den Westernblot wurde zur Sichtbarmachung der durch den Erstantikörper erkannten Proteinbanden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper Immunopure™ der Firma Pierce /Thermo, Bonn verwendet.

#### 5.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
17β-Östradiol (E2)	Sigma, Taufkirchen
<sup>32</sup> P Phosphorsäure	Hartmann Analytic, Braunschweig
<sup>32</sup> P γ ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1))	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat )	Roth, Karlsruhe
ATP (Adenosin 5'-Triphosphat) Dinatrium-Salz	Sigma, Taufkirchen
Bradfordreagenz	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Bovine Serum Albumin)	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coenzym A Hydrat	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau (Serva Blue G)	Serva, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix, je 10 mM	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
Emerald Lumineszenz-Verstärker	Tropix, Bedford (USA)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Galacton	Tropix, Bedford (USA)
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
Glycylglycin	Applchem, Darmstadt
Interleukin 4	Immunotools
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Applchem, Darmstadt
LB Medium	Roth, Karlsruhe
Luziferin, freie Säure	Applchem, Darmstadt
Magermilchpulver	Applchem, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
NP-40 (Nonidet P-40-Substitute)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Polyethylenimin (PEI) 36 µM	Sigma, Taufkirchen

Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1	Sigma, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2	Sigma, Taufkirchen
p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP)	Fluka
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitor Mix „Complete“, EDTA-frei	Roche, Mannheim
RNAse A	Roth, Karlsruhe
Thymidin	Sigma, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

### 5.5 Inhibitoren für die Zellkultur

Die Inhibitoren für die Zellkultur wurden als Stocklösung jeweils 1000-fach konzentriert angesetzt und nachfolgend 1:1000 im Medium eingesetzt.

Inhibitor	Lösungsmittel	verw. Endkonzentration	Firma, Ort
Calyculin A	Ethanol	0,25 – 50 nM	Alexis Biochemicals, Lörrach
Okadaic acid	Ethanol	0,25 – 10 nM	
Staurosporin	DMSO	200 nM	
Roscovitin	DMSO	3 $\mu$ M	
PD 98059	DMSO	50 $\mu$ M	
SB 202190	DMSO	10 $\mu$ M	
Colcemid	Ethanol	100 nM	
SP600125	DMSO	200 nM	
Orthovanadat	H <sub>2</sub> O	0,5 mM	Sigma, Taufkirchen
Hydroxyharnstoff	H <sub>2</sub> O	0,5 mM	Sigma, Taufkirchen

### 5.6 Materialien für Westernblot

Produkt	Firma, Ort
PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45 $\mu$ m)	Millipore, Eschborn
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
SuperSignal <sup>TM</sup> West Pico Luminol/ Enhancer Solution	Thermo Scientific, Rockford
Immobilon <sup>TM</sup> Western HRP Substrate Luminol Reagent	Millipore, Eschborn
Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Fuji Film Düsseldorf
Euromed Plus Medical X-Ray Screen	

## 5.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, München bezogen

Name	Verwendung	Anneal°C	Sequenz
hSOCS-1 for	ChIP	61	GTTTCTTCCGCAGCCGGGTAG
hSOCS-1 rev	ChIP	61	GGCCGCGGTCTCTGGTCTTGG
18s for	q RT-PCR	58	CGGCTACCACATCCAAGGA
18s rev	q RT-PCR	58	CCAATTACAGGGCCTCGAAA
IgEpsilon for	q RT-PCR	58	CACATCCACAGGCACCAAAT
IgEpsilon rev	q RT-PCR	58	ATCACCGGCTCCGGGAAGTA
TARC for	q RT-PCR	58	CCAGGGATGCCATCGTTTTTGTAAGTGTGC
TARC rev	q RT-PCR	58	CCTCACTGTGGCTCTTCTTCGTCCCTGGAA
S6 TAD for	Klonierung	52	ATTCGGATCCCGTAGTCATGGCATC
S6 TAD rev	Klonierung	52	CGATATGATCAGTCATCGACTGATGC
siRNAs	Verwendung	-	Sequenz
siPP2A Nr.1	Knockdown		ACCAUAUAUCGACCUGAAUGGAAAUG
siPP2A Nr.2	Knockdown		UAAGGAUAGCAGCAAACAUAUUGGAG
siNCoA-1	Knockdown		GGCAGAACAGTTGGACAATCTAUUU
siGFP	Knockdown		siLentMer "Validated siRNA" GFP (jellyfish)

## 5.8 Vektoren

### 5.8.1 Vektoren für die heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Vektorname	kodiertes Insert	Referenz
pGex-2-TEV hSTAT-TAD 642-847	hSTAT6 TAD	diese Arbeit
pGex-2T ER-EF	Östrogenrezeptor, Teile E /F	(Pfitzner et.al)
pGex-5x-1 hNCoA-1 Pas	NCoA-1 AS 260-370	Doktorarbeit Marco Lodrini
p-Gex-4T3 PP2A A	PP2A A V.I.	Markus Heim, Uniklinik Basel
pGex- 4T3 PP2A C	PP2A C V.I.	Markus Heim, Uniklinik Basel

### 5.8.2 Expressionsvektoren zur transienten Überexpression in eukaryotischen Zellen

Vektorname	kodiertes Insert	Referenz
EGFP-STAT6 f.l.	STAT6 EGFP-markiert	Labor Pfitzner, Phillip Schild
pSG6 hSTAT6 f.l.	hSTAT6 V.I.	(Litterst and Pfitzner 2002)
p RSV ER	Östrogenrezeptor V.I.	(Ali, Metzger et al. 1993)
pSG5 hSRC-1e	hSRC-1 V.I.	(Malcolm Parker, London)
pSG5 hSRC-1e S395A	hSRC-1 V.I. S395A	diese Arbeit
pSG5 hSRC-1e S395E	hSRC-1 V.I. S395E	diese Arbeit
pMT NCoA-1 AS 1-260	NCoA-1 AS 1-260	Doktorarbeit Marco Lodrini
pMT NCoA-1 AS 260-370	NCoA-1 AS 260-370	Doktorarbeit Marco Lodrini
pCS2+ NCoA-1 AS 213-462	NCoA-1 AS 213-462	(Litterst and Pfitzner 2001)

pCS2+ NCoA-1 AS 569-805	NCoA-1 AS 569-805	Ludger Klein-Hitpass, Universitäts-Klinikum Essen
pCS2+ NCoA-1 AS 804-1032	NCoA-1 AS 804-1032	
pCS2+ NCoA-1 AS1258-1442	NCoA-1 AS1258-1442	
PP2A-HA	PP2A V.I.	(Duong, Filipowicz et al. 2004)
GFP	Grün fluoresceiren-des Protein	Clontech
pcDNA 3.1	-	Invitrogen

### 5.8.3 Vektoren für Reporter-genexperimente

Vektorname	Verwendung	Referenz
pGL2 E4 TK-luc	STAT6 Reporter	(Moriggl, 1997)
pGI2 ERE TK-luc	Östrogenrezeptorreporter	Ludger Klein-Hitpass, Universitätsklinikum Essen
pCH110	Expression Beta-Galactosidase	(Wakao, 1994)

## 5.9 Bakterien und deren Medium

Verschiedene *Escherichia coli*-Stämme wurden für die Expression von heterologen Fusionsproteinen (BL21 (DE3)pLysS) und für die Vermehrung von Vektor-DNA (XL-1 blue) verwendet.

Stamm	Genotyp	Firma
XL-1 blue	<i>endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>-</sup>) sup E44 thi<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> recA1 gyrA96 re/A1 80dlacI<sup>q</sup> ZD M15</i>	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	<i>FompT hsdSB<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysS (Cm<sup>R</sup>)</i>	Stratagene

*E. coli* wurde in LB Medium unter Selektionsdruck der transformierten vektorkodierten Antibiotikumsresistenz (Ampicillin 100 mg / L, Kanamycin 25 mg / L) gehalten. Zusätzlich wurde BL21(DE3)pLysS unter Chloramphenicol-Selektion (34mg/ L) gehalten. Zur Herstellung von Festmedium wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Agar (14 g / L) zugegeben.

## 5.10 Zellkulturlösungen

Zellkulturlösung	Hersteller
DMEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium), 4,5 g/l D-Glukose	PAA, Pasching
DMEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium), 4,5 g/l D-Glukose, phenolrotfrei	PAA, Pasching
RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute Medium), 4,5 g/l D-Glukose	Lonza, Verviers (Belgien)
phosphatfreies DMEM Low Glucose	BioWest, Nuaille
DMEM phenolrotfrei	PAA, Pasching
L-Glutamin	Lonza, Verviers (Belgien)
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Verviers (Belgien)

Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching
Fötale Kälberserum (FKS)	GibcoBRL, Grand Island
Trypsin-EDTA (1x)	GibcoBRL, Grand Island
Isoton II	Becton Dickinson, Heidelberg

### 5.11 Zelllinien (human)

Zelllinie	Zelltyp	ATCC-Nummer	Medium
A549	Lungenepithelzellen	CCL-185	RPMI
BJAB	Burkitt B-Zell Lymphom	nicht verfügbar	RPMI
HEK 293T	fötale Nierenzellen	CRL-1573	DMEM
Ramos	Burkitt B-Zell Lymphom	CRL-1923	RPMI
THP-1	Monozyten	TIB-202	RPMI

Für die Kultivierung der Zellen wurden den Medien 10% FKS, 1 mM Glutamin und 100 U/ ml Penicillin/ Streptomycin (Endkonzentrationen) zugegeben. Versuchsbedingte abweichende Kultivierung ist der Beschreibung Experiments zu entnehmen.

### 5.12 Geräte

Gerätname	Verwendung	Hersteller
FLUOstar Optima	Messung von Luziferaseaktivität	BMG Labtech, Offenburg
ELx 808	Proteinbestimmung und Phosphataseaktivitätsmessung	BioTek, Bad Friedrichshall
Mylq Single Color Real-Time PCR Detection System	Quantitative PCR	Biorad, München
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	NanoDropTechnologies, Wilmington
Mini Protean 3 Cell System, SDS-Gelelektrophorese	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	Biorad, München
Mini Protean 3 Cell System, Tankblot	Blotten von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen auf Membranen	Biorad, München
Coulter Counter	Zählen von Zellen	Beckman Coulter, Krefeld
Branson Sonifier	Ultraschallbehandlung von Lysaten	Branson, Danbury
FACS Canto	Messung zellulären DNA-Gehalts	BD Biosciences, Heidelberg
Amata Nucleofector	Transfektion von Ramos B Zellen	Lonza, Verviers

## 6 Methoden

### 6.1 Methoden zum Arbeiten mit Bakterien

#### 6.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* für die Transformation

Lösungen: LB Medium, TSB Medium (LB Medium mit 10% PEG 6000, 5% Dimethylsulfoxid, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub>)

100 ml der Hauptkultur wurde mit 1 ml einer über Nacht Kultur von *E. coli* XL1 blue angeimpft und auf dem Schüttler bei 37° C bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub>=0,5 angezogen. Die Bakterien wurden im Zentrifugenröhrchen bei 3000 g für 10 min bei 4°C sedimentiert und in 10 ml TSB Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert (pro Transformationsansatz 50 µl) bei –80°C eingefroren und bei –80°C aufbewahrt.

#### 6.1.2 Transformation von *E. coli*

Lösungen: 5 x KCM-Puffer (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl<sub>2</sub>, 0,25 M MgCl<sub>2</sub>), LB Medium

Die für die Transformation vorbereiteten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und pro Transformation jeweils 50 µl Bakteriensuspension vorgelegt. Die zu transformierende DNA wurde in 1 x KCM-Puffer (ad. 40 µl ddH<sub>2</sub>O und 10 µl 5 x KCM Puffer) gelöst. Die DNA-Lösung wurde zu den vorgelegten *E. coli* gegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren mit den Bakterien gemischt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis und anschließend 5 min bei Raumtemperatur. Den Transformationsansätzen wurde 1 ml LB Medium zugegeben und sie wurden für die Expression der vektorkodierten Antibiotikumsresistenz für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 10.000 g für 30 sek. bei RT sedimentiert, 1 ml Überstnd abgenommen und verworfen. Die verbleibenden 100 µl wurden auf antibiotikumhaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 6.1.3 Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli* (Minipräparation)

Lösungen: Puffer 1, 2 und 3 aus dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen  
TE-Puffer (10 mM Tris/HCL pH 8,0 , EDTA 1 mM)

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde mittels der alkalischen Lyse mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt. Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* im 1,5 ml-Reaktionsgefäß sedimentiert (10.000 g für 1 min) und das Bakteriensediment in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Resuspension der Bakterien wurden für die Lyse 150 µl Puffer 2 zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer 3 wurden die Ansätze 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde geklärt (Zentrifugation 19.000 g für 10 min bei 4°C) und 400 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die DNA gefällt (19.000 g für 10 min bei 4°C) und der

Überstand verworfen. Die Trocknung der DNA erfolgte bei RT. Die DNA wurde anschließend in TE-Puffer gelöst.

#### **6.1.4 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli* (Maxi-Präparation)**

Für die präparative Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen, Hilden eingesetzt. Die Kultivierung der Bakterien, sowie die Plasmidisolierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

### **6.2 Methoden zum Umgang mit DNA**

#### **6.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine OD-Einheit einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die DNA-Konzentration ergibt sich demnach aus:

gemessener OD<sub>260</sub>-Wert x Verdünnungsfaktor x 50 = Konzentration DNA in µg/ml

#### **6.2.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme**

Die Spaltung von DNA erfolgte mit dem jeweiligen Restriktionsenzym unter Berücksichtigung der vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer und Temperatur) über Nacht.

#### **6.2.3 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Für die 5'-Dephosphorylierung von geschnittenen Plasmiden zur Vermeidung von Religationen wurde die alkalische Phosphatase aus Kälbern von New England Biolabs verwendet. Hierfür wurden 0,5 Units alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP) pro µg DNA in den Spaltungsansatz gegeben und die DNA für 1 h bei 37°C dephosphoryliert.

#### **6.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von Plasmiden und DNA-Fragmenten zur Klonierung wurde mit der T4-DNA-Ligase von New England Biolabs im zugehörigen Puffer über Nacht bei 16°C nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Ligationsreaktion wurde die DNA-Ligase durch Inkubation des Ligationsansatzes für 20 min bei 60°C zur Erhöhung der Transformationseffizienz inaktiviert.

Ein Standardansatz bestand aus 300 ng Vektor und Insert im Verhältnis 1:1 bis 1:10 in einem Volumen von 10 µl.



### 6.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen: 10 x TBE (800 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0), 6 x DNA-Probenpuffer (30% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylencyanol)

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten, sowie zur präparativen Aufarbeitung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Hierfür wurden in Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden Fragmente Gele mit 0,8 % bis 2 % w/v Agarose in 1 x TBE- Puffer verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurden den Gelen vor dem Gießen 1 µg / ml Ethidiumbromid zugegeben. Der in die DNA interkalierte Farbstoff wird nach dem Gellauf durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden geeignete DNA-Größenstandards verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 10 V / cm<sup>2</sup>.

### 6.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen, Hilden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 6.2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen, Hilden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 6.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein Standard-PCR Ansatz enthielt: 50 ng Template (Plasmid-DNA), je 0,4 µmol Primer for / rev, 1x PCR-Puffer mit 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP's, 1 Unit thermostabile Pfu DNA-Polymerase im 25 µl Ansatz.

### 6.2.9 PCR-basierte Mutagenese

Die PCR-basierte Mutagenese zur Einführung von Mutationen wurde mit der KOD Hot Start DNA-Polymerase von Novagen unter Beachtung der Herstellerangaben in 25 µl Ansatz durchgeführt. Als Vorlagen-DNA wurden je 25 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Für das Design der Primersequenzen für die Mutagenese wurde das Programm: [www.stratagene.com/qcprimerdesign](http://www.stratagene.com/qcprimerdesign) verwendet. Nach der PCR wurde die methylierte Matrizen-DNA mit 20 U Enzym DpnI für 3 h bei 37°C gespalten und die amplifizierte unmethylierte und nicht geschnittene DNA in *E. coli* transformiert.

### 6.3 Methoden zum Umgang mit RNA

#### 6.3.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels einer Kombination aus dem „peqGOLD TriFast™“ Reagenz von Peqlab, Erlangen und dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen, Hilden nach den Angaben der Hersteller. Hierfür wurden 5 bis  $10 \times 10^6$  Zellen in 750 µl „peqGOLD TriFast™“ Reagenz lysiert und die wässrige Phase über das „RNeasy Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### 6.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entspricht eine OD-Einheit einer RNA-Konzentration von 33 µg / ml. Die RNA-Konzentration ergibt sich demnach aus:

$$\text{OD}_{260}\text{-Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 = \text{Konzentration RNA in } \mu\text{g / ml}$$

#### 6.3.3 Reverse Transkription von RNA

Die Umschreibung von RNA für die anschließende Quantifizierung mittels quantitativer PCR erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas, nach Herstellerangaben.

#### 6.3.4 Quantitative PCR mit dem i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Biorad)

Die Quantifizierung von DNA-Proben wurde im i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detektionssystem (Biorad, München) durchgeführt. Hierfür wurde das Absolute SYBR Green Fluorescein Mix von Thermo Scientific verwendet. Ein Ansatz bestand aus 7,5 µl des SYBR green Mixes, je 0,25 µl der spezifischen Oligonukleotide (10 pmol / µl) und 3 bis 6 µl an Vorlagen-DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Zum Ausgleich von messbedingten Schwankungen erfolgte jede Messung in Triplikaten.

### 6.4 Standard Zellkulturmethoden

#### 6.4.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden im Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator von Sanyo bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% v/v kultiviert.

#### 6.4.2 Passagieren von eukaryotischen Zellen

Für das Passagieren adhärenter Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend für 5 bis 10 min mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde

mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion durch Zugabe von Medium abgestoppt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die benötigte Zellzahl auf Zellkulturplatten oder in Zellkulturflaschen ausgebracht.

#### **6.4.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Lösungen: Einfriermedium (FKS mit 10% DMSO)  
Zellkulturmedium (DMEM oder RPMI)

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden adhärenente Zellen zunächst durch Trypsinieren von der Platte gelöst, Suspensionszellen direkt sedimentiert (1100 g für 3 min bei RT). Die sedimentierten Zellen wurden in Einfriermedium (FKS mit 10% v/v DMSO) resuspendiert und in 0,5 bis 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte im Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container bei –80°C für 4 Stunden. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei –150°C. Zum Auftauen wurden die Zellen in der Hand rasch aufgetaut und anschließend in 5 ml Medium aufgenommen. Zur Entfernung des DMSO wurden sie sedimentiert (1100 g für 3 min bei RT) und der Überstand verworfen. Für das erste Anwachsen wurde Medium mit 20% fötalem Kalberserum verwendet.

#### **6.4.4 Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen in Suspension in Isoton II 1:20 oder 1:50 verdünnt. Durch den Coulter Counter von Beckman Coulter, Krefeld wurde die Anzahl der Partikel bestimmt. Hierbei wurden die Partikel einer Größe von 5 bis 18 nm gezählt.

### **6.5 Methoden zum Umgang mit Zellen**

#### **6.5.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Lösungen: PEI-Stammlösung (150 mM NaCl, 36 µM PEI)  
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

293T Zellen wurden mit PEI transfiziert. Die DNA wurde in PBS im 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und gut gemischt. Nach zweiminütiger Inkubationszeit bei RT wurde PEI zugegeben und der Ansatz sofort durch antippen gemischt. Während einer 30 minütigen Inkubationszeit bei RT wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen auf serumfreies Medium gewechselt. Danach erfolgte die Zugabe der Transfektionsansätze durch zuträufeln und anschließendes verteilen im Medium durch schwenken. Nach vier Stunden wurde das Medium gegen Medium mit 10% FKS gewechselt. Das Verhältnis von DNA zu PBS und PEI-Lösung für die Transfektion liegt bei:

1 µg DNA ad. 27 µl PBS und Zugabe von 3 µl PEI Lösung.

### 6.5.2 Transfektion von HEK 293T Zellen mit siRNA

Lösungen: DMEM Medium mit 10% FKS, Silentfect Reagens, siRNA-Lösung 10  $\mu$ M in Duplexpuffer

siRNAs wurden in 293T Zellen mit dem SilentFect Reagenz von Biorad nach Angaben des Herstellers in einer Konzentration von 10 nM transfiziert. Als Volumenverhältnis von siRNA Lösung zu Transfektionsreagenz wurde 1:1 verwendet.

### 6.5.3 Transfektion von Ramos B Zellen mit siRNA

Lösungen: Puffer V des Amaxa Systems, siRNA-Lösung 10  $\mu$ M in Duplexpuffer (30 mM HEPES pH 7,5 , 100mM KAc)

Für die Transfektion von synthetischen siRNAs in humanen Ramos B Zellen wurde das Amaxa System mit dem Puffer V nach Herstellerangabe verwendet. Pro Probe wurden  $2 \times 10^6$  Ramos B Zellen aus einer Kultur von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml sedimentiert, das Medium abgenommen und aufbewahrt. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l vorgewärmten Puffer V resuspendiert und 40nM siRNA (bezogen auf das Zellkulturvolumen, bei  $2 \times 10^6$  also 2 ml) zugegeben. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in die Elektroporationsküvette überführt und nach 2 minütiger Inkubationszeit der Elektroimpuls (Program: O-06) durchgeführt. Die Ansätze wurden im zuvor abgenommenen konditionierten Medium aufgenommen und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Dabei wurde die Zelldichte durch Zugabe von frischem Medium auf  $1 \times 10^6$  Zellen / ml konstant gehalten.

### 6.5.4 Herstellung von NETN-Gesamtzellextrakten

Lösungen: PBS, NETN-Puffer (20 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2% NP-40, 10% Glycerin, Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren frisch zugeben)

Die Zellen wurden geerntet und im Medium bei 700 g für 3 min bei RT im Zentrifugenröhrchen sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in je 1 ml PBS aufgenommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 510 g für 1 min bei 4°C in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in geschätztem 5-fachen Volumen an NETN-Puffer (mit Inhibitoren versetzt) durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 10 auf Eis unter gelegentlichem intensiven Schütteln. Die Lysate wurden bei 21910 g für 10 min bei 4°C in der Tischzentrifuge geklärt und die Überstände in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und die Konzentrationen gegebenenfalls durch Verdünnen einzelner Proben mit NETN-Puffer (mit Inhibitoren versetzt) angeglichen. Die Proben wurden direkt weiter verarbeitet (Koimmunpräzipitationsexperimente) oder bei -20°C gelagert.

### 6.5.5 Metabolische Markierung von Zellen mit $P^{32}$ Phosphat

Lösungen: physiologische Kochsalzlösung (150 mM NaCl)  
phosphatfreies Medium mit phosphatreduziertem fötalen Kälberserum

Für die radioaktive Markierung von Zellen wurden pro Probe  $20 \times 10^6$  BJAB Zellen durch Zentrifugation (1100 g für 3 min) sedimentiert und in phosphatfreiem Medium aufgenommen. Für die Markierung von 293T Zellen wurde pro Probe eine 6 cm Schale verwendet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend phosphatfreies Medium mit phosphatreduziertem FKS zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation wurde das Medium erneut durch frisches phosphatfreies Medium ersetzt und pro Probe  $100 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$  Phosphorsäure zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation zur Aufnahme der Phosphorsäure durch die Zellen wurden diese weitere zwei Stunden mit den angegebenen Inhibitoren behandelt. Anschließend erfolgte die Herstellung von NETN-Gesamtzellextrakten. Der Phosphorylierungszustand von interessierenden Proteinen wurde durch die spezifische Immunpräzipitation der Proteine aus den NETN-Lysaten mit anschließender SDS-PAGE untersucht.

### 6.5.6 Zytoplasma/ Kernfraktionierung

Lösungen: Hypotonischer Puffer (20 mM HEPES pH 7,9 , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,2% NP-40, Protease- und Phosphataseinhibitoren frisch zugeben)  
NETN-Puffer (20 mM Tris/HCl pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2% NP-40, 10% Glycerin, Complete 1:40 und Phosphataseinhibitormix 1:100 frisch zugeben)

Die Zytoplasma/ Kernfraktionierung von eukaryotischen Zellen wurde für die Untersuchung subzellulärer Verteilung von Proteinen, sowie für die Extraktion von Zellkernen für die Chromatinimmunpräzipitation verwendet. Die Zellen wurden bei 700 g für 3 min bei RT im Zentrifugenröhrchen sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nach Resuspension in 1 ml PBS in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in der Tischzentrifuge bei 500 g für 1 min bei  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in geschätztem 5-fachem Volumen (bei ChIP standardmäßig 300  $\mu\text{l}$ ) an hypotonischem Puffer rasch resuspendiert. Die Lyse der Zellen durch platzen erfolgte für 5 min auf Eis. Nach Zentrifugation bei 690 g für 1 min bei  $4^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt (für die Untersuchung der subzellulären Proteineverteilung) oder verworfen (für ChIP) . Die Kernfraktion wurde durch vorsichtige Resuspension in 500  $\mu\text{l}$  hypotonischem Puffer gewaschen und die Kerne erneut bei 690 g für 1 min bei  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert. Die Lyse der Kerne erfolgte durch Zugabe gleichen Volumens NETN-Puffer wie zuvor der hypotonische Puffer (bei ChIP standardmäßig in 300  $\mu\text{l}$  ChIP Lysepuffer) und mehrmaliges auf- und abpipettieren. Die Kernfraktion wurde volumenabhängig unterschiedlich intensiv (5 sek bei 10 bis 30%, für ChIP 8 sek mit 30%) in Branson Sonifier mit Ultraschall behandelt. Das Kernlysate und die zytoplasmatische Fraktion wurden danach

bei 21910 g für 10 min bei 4°C geklärt und die Überstände in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Für die Untersuchung der Proteinverteilung wurden Proteinbestimmungen der Proben durchgeführt, für die ChIP wurden die Proben laut ChIP Protokoll weiter behandelt (siehe Chromatinimmunpräzipitation).

#### **6.5.7 Messung der Luziferase- / $\beta$ -Galactosidaseaktivitäten aus Reporter-genexperimenten**

**Lösungen:** Lysispuffer (25 mM Glycylglycin, 15% Glycerin, 8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 1 mM DTT, Complete 1:40 frisch zugeben)  
 Luziferasesubstrat (20 mM Tricin, 1 mM  $\text{Mg}(\text{CO}_3)$  4 x  $\text{Mg}(\text{OH})$ , 2,5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 mM EDTA, Luziferin 22,42 mg, ad.160 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , pH 7,8 mit KOH einstellen, danach Zugabe von 1 mM DTT, 0,5 mM ATP, 0,04 g Coenzym A, ad. 200  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) Reaktionspuffer (100 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 8, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% Galacton), Verstärkerlösung (200 mM NaOH, 10% v/v Emerald)

Mit Luziferasereproterplasmiden transfizierte 293T Zellen im 24-well Maßstab wurden geerntet und 1 x mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte in 100-400  $\mu\text{l}$  Lysispuffer. Nach Inkubation 10 min auf Eis wurde das Lysat bei 21910 g für 10 min bei 4°C geklärt und je 10  $\mu\text{l}$  in eine weiße Mikrotiterplatte auf Eis vorgelegt. Die Messung erfolgte im FLUOstar Optima Photometer, wobei je 50  $\mu\text{l}$  Luziferasesubstrat von Gerät zugegeben und die emittierte Lumineszenz quantifiziert wurde. Die Normierung von versuchsbedingten Schwankungen erfolgte über die Messung der Aktivität der Kotransfizierten Beta-Galactosidase. Hierfür wurden je 3  $\mu\text{l}$  der Lysate in die Mikrotiterplatte vorgelegt und 30  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln (Platte abdecken), wurden die  $\beta$  Galactosidaseaktivitäten durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Verstärkerlösung im FLUOstar Optima Photometer durch erfassen der Lumineszenz gemessen.

#### **Zellzyklusanalyse durch Messung des DNA-Gehalts mittels Propidiumiodidfärbung**

**Lösungen:** 70% v/v Ethanol, 38 mM Natriumzitat, 10 mg/ ml RNase A, 2,5 mg/ ml in  $\text{H}_2\text{O}$  Propidiumiodid, PBS

Die Messung des DNA-Gehalts von Zellen zur Bestimmung von Zellzyklusphasen wurde durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid durchgeführt. HEK 293T Zellen wurden durch trypsinieren von den Schalen gelöst und in FACS-Röhrchen bei 700 g für 1 min bei RT sedimentiert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 70% Ethanol unter intensiven Schütteln resuspendiert und bei -20°C für 20 min fixiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml Natriumzitatlösung und erneute Sedimentierung bei 700 g für 1 min bei RT. Der Überstand wurde verworfen und 400  $\mu\text{l}$  Natriumzitatlösung, 5  $\mu\text{l}$  RNase A Lösung und 50  $\mu\text{l}$  PI Lösung zugegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 20 min bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben im FACS gemessen.

## 6.6 Proteinbiochemische Methoden

### 6.6.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Lösungen: LB-Flüssigmedium und LB-Platten mit Ampicillin (100 mg/L) und Chloramphenicol (34 mg/L), IPTG-Stammlösung von 0,5 M, GST-Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH8, 250 mM NaCl, 10% v/v Glycerin, 1% v/v Triton-x-100)

Die Herstellung von GST-Fusionsproteinen erfolgte im *E. coli* -Stamm BL21 pLysS. Eine Kolonie transformierter und über Antibiotika selektierter BL21 pLysS Bakterien wurde über Nacht bei 37°C und 220 Upm in 25 ml LB-Medium mit Antibiotika als Vorkultur angezogen. Die Hauptkultur (500 ml) wurde mit 1% ihres Volumens (5 ml) aus der Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer Dichte von  $OD_{600}=0,5$  gezogen. Anschließend wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Die Expression erfolgte bei RT für 4-5 Stunden auf dem Schüttler bei 200 Upm. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 g für 15 min bei 4°C sedimentiert, in GST-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (10 ml Lysepuffer pro 500 ml Kulturvolumen) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### 6.6.2 Herstellung von bakteriellen Rohlysaten

Die in GST-Lysepuffer resuspendierten und eingerorenen Bakterien wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Durch das Frieren und Tauen platzen zunächst wenige Bakterien und setzen das durch sie gebildete Lysozym frei, welches zur Lyse weiterer Bakterien führt. Die Lyse erfolgte für 15 min bei RT unter gelegentlichem intensiven schütteln. Das Lysat wurde bei 21.910 g für 10 min bei 4°C geklärt und aliquotiert bei -80°C gelagert.

### 6.6.3 Kopplungstest von GST-Fusionsproteinen für GST-Pulldown-Untersuchungen

Lösungen: GST-Lysepuffer (250 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 10% v/v Glycerin, 1% v/v Triton-X-100) 2 x SDS Lämmli-Puffer (100 mM Tris Ph 6,8 4% w/v SDS, 10% Glycerol, 2% Beta-Mercaptoethanol, 1 % w/v Bromphenolblau)

Um die für einen GST-Pulldown verwendete Menge von 5 µg Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose-Beads zu binden, muß zunächst das einzusetzende Volumen Rohlysate bestimmt werden. Hierfür wurden je 10 µl reine Beads dreimal mit GST-Lysepuffer äquilibriert und verschiedene Volumina (5 bis 300 µl) Rohlysate in die Kopplung eingesetzt. Diese erfolgte in 300 µl GST-Lysepuffer für 1 h bei 4°C auf dem Rotator. Anschließend wurden die Beads dreimal mit je 500 µl GST-Lysepuffer gewaschen (Zentrifugation je mit 500 g für 30 sek). Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 25 µl 2-fach SDS-Puffer. Die Proben wurden in die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Abschätzung der gebundenen Proteinmenge durch Coomassie-Färbung wurden zum Vergleich 5 und 20 µg Rinderserumalbumin (BSA) aufgetragen.

#### 6.6.4 In-vitro Transkription/Translation von Proteinen

Die isolierte Herstellung von NCoA-1 Protein und seinen Mutanten für die Untersuchung im GST-Pulldown Experiment erfolgte mit dem TNT Quick Coupled Transcription/Translation System von Promega nach Herstellerangaben.

#### 6.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen von Zellysaten wurden nach Bradford quantifiziert. BSA wurde für die Erstellung der Eichgeraden verwendet. Das Bradford-Reagenz wurde mit H<sub>2</sub>O 1:5 vorverdünnt und je 600 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Jeweils 3 µl des BSA-Standards (Konzentrationen 0, 4, 8 und 12 µg/µl) und jeweils 3 µl der zu bestimmenden Proben wurden zugegeben und gemischt und je 150 µl in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt. Nach 5 min Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption im ELx 808 Photometer, Bad Friedrichshall bei 485 nm.

#### 6.6.6 Immunpräzipitation

Lösungen: NETN-Puffer (siehe Herstellung von NETN-Gesamtzellextrakten) 2 x  
 SDS Lämmli-Puffer (100 mM Tris Ph 6,8 4% w/v SDS, 10% Glycerol, 2% Beta-Mercaptoethanol, 1 % w/v Bromphenolblau)

Die Immunpräzipitation wurde je nach Anwendung und zu untersuchendem Protein jeweils aus 200 – 1500 µg NETN-Extrakt durchgeführt. In die Präzipitation wurden je 1 bis 4 µg Antikörper und 15 µl Protein Agaroseharz (dreimal mit NETN Puffer äquilibriert) eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte für 4 bis 16 h auf dem Rotator bei 4°C. Anschließend wurde das Harz bei 500 g für 30 sek bei 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte dreimaliges waschen mit NETN-Puffer (Zentrifugation wie zuvor) und anschließend die Elution der gebundenen Proteine und Antikörper durch Zugabe von 25 µl 2-fach SDS-Probenpuffer.

#### 6.6.7 Koimmunpräzipitation

Lösungen: siehe Immunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation wurde analog zur Immunpräzipitation durchgeführt. Neben dem Nachweis der Immunpräzipitation wurde ein potentiell interagierendes Protein im Westernblot nachgewiesen. Parallel zur spezifischen Immunpräzipitation durch einen spezifischen Antikörper wurde jeweils eine Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Antikörper gleicher Spezies durchgeführt, um eine unspezifische Präzipitation des potentiell interagierenden Proteins auszuschließen.



### 6.6.8 Phosphataseassay

Lösungen: Lysepuffer (siehe NETN-Puffer, hier ohne EDTA !), Reaktionspuffer (100 mM Hepes pH 7,5 , 150 mM NaCl. Frisch zugeben: 1 mM DTT, 12,5 mM pNPP, Proteaseinhibitor Complete) keine Phosphataseinhibitoren zugeben !

Die Lyse der Zellen erfolgte analog zur Herstellung von NETN-Gesamtzellextrakten im Lysepuffer ohne EDTA und ohne Phosphataseinhibitoren. Je 10 µl der Lysate wurden in eine durchsichtige 96 Loch Platte vorgelegt und mit 40 µl Reaktionspuffer versetzt. Die Reaktion erfolgte im Dunkeln (abgedeckt) bei 37°C für ca. 5 bis 30 min bis zu einer schwachen Gelbfärbung. Die Reaktion wurde mit 50 µl 1N NaOH abgestoppt, die Absorption bei 405 nm im Photometer gemessen und gegen eine Negativkontrolle mit NETN-Puffer anstatt Lysat normiert. Die Messung immunpräzipitierter Phosphataseaktivität wurde in 60 µl Reaktionspuffer auf das Protein Agaroseharz gegeben und die Ansätze im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Durch gelegentliches Schütteln wurden gebundene PP2A und der Lysepuffer vermischt. Bei leichter Gelbfärbung nach ca. 60 min wurde die Reaktion mit 60 µl 1 N NaOH abgestoppt und das Harz in der Zentrifuge für 1 min bei 700 g sedimentiert. 100 µl des Überstandes wurden in eine neue 96 Loch Platte überführt, die Absorption gemessen und gegen die Negativkontrolle NETN-Puffer in Reaktionspuffer normiert.

### 6.6.9 SDS-Gelelektrophorese

Lösungen: SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 25 mM Glycin, 3,5 mM SDS), 4 x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, 14 mM SDS), 4 x Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 14 mM SDS), Acrylamislösung, APS 0,05%, TEMED 0,1%

Die denaturierende SDS-PAGE wurde im Mini Protean 3 Cell System von Biorad durchgeführt. Denaturierende SDS-Polyacrylamidgele wurden mit einem Anteil von 8 bis 14% Acrylamid im Trenngel hergestellt. Hierfür wurden je 5 ml an SDS Trenngel und 1,5 ml an Sammelgellösung mit 4% Acrylamid pro Gel hergestellt hergestellt. Der Gellauf erfolgte in Elektrolytlösung bei 20 mA pro Gel bei einer Geldicke von 1 mm. Zur Abschätzung der molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine wurde ein Größenmarker aufgetragen.

### 6.6.10 Coomassie-Färbung von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen

Lösungen: Coomassie-Färberlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,25% Coomassie brilliant blue), Entfärber (wie Färber ohne Coomassie brilliant blue)

Die Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung für 10 min in Coomassie Färbelösung unter schwenken in einer Schale bei RT gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und das Gel mit Wasser gewaschen. Die Entfärbung erfolgte mit Entfärbelösung unter schwenken in der Schale bei RT für 2 bis 4 h. Anschließend wurde das Gel mit H<sub>2</sub>O über Nacht unter schwenken weiter entfärbt.

Für die sensitivere Detektion geringer Proteinmengen für die anschließende Untersuchung in der Massenspektrometrie wurde das Colloidal Blue Staining Kit von Invitrogen nach Angaben des verwendet.

#### 6.6.11 Trocknung von SDS-Gelen

SDS-Gele wurden nach dem Gellauf zur Aufbewahrung nach Coomassiefärbung oder für den Nachweis proteingebundener Radioaktivität nach Immunpräzipitation aus radioaktiv markierten NETN-Gesamtzellextrakten getrocknet. Hierfür wurden die Gele auf ein Whatman-Papier gelegt und im Geltrockner unter Vakuum für 2 h getrocknet.

#### 6.6.12 Westernblot

Lösungen: 2 x SDS Lämmli-Puffer (100 mM Tris pH 6,8 4% w/v SDS, 10% Glycerol, 2% Beta-Mercaptoethanol, 1 % w/v Bromphenolblau), TBST (0,9% NaCl, 20 mM Tris/ HCl pH 7,5, 0,05% Tween), TBST mit Milchpulver (5% w/v zur Absättigung der Membran, 2,5% w/v für das Ansetzen der Antikörperlösung), Blotpuffer (Elektrolytlösung SDS-Gelelektrophorese mit 20% Ethanol)

Das Übertragen von in SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben erfolgte mit den Protean 3 Mini Trans-Blot System von Biorad. Nach dem Gellauf wurde das Gel in die Klammer des Systems auf einen Schwamm und eine Lage Whatmanpapier gelegt und mit einer in Ethanol aktivierten Westernblotmembran luftblasenfrei bedeckt. Diese wurde ebenfalls luftblasenfrei mit einer Lage Whatmanpapier und einem Schwamm bedeckt. Die Übertragung der Proben erfolgte bei  $3 \text{ mA} / \text{cm}^2$  für 2 h bei RT. Nach blotten der Proteine wurde die Membran 5 min in TBST, dann 15 min in TBST mit 5% Milchpulver unter schwenken bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Antikörperlösung (TBST mit 2,5% Milchpulver mit Erstantikörper, Verdünnung siehe Materialteil) überführt und bei 4°C auf dem Roller über Nacht inkubiert. Die Membran wurde im Röhrchen dreimal mit jeweils 5 ml TBST auf dem Roller gewaschen und anschließend 5 ml TBST Zweitantikörperlösung (2,5% w/v Milchpulver in TBST mit Zweitantikörper in 1:5000 Verdünnung) zugegeben. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte bei 4°C auf dem Roller für 2-6 h. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST in der Schale gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die Meerrettich-Peroxidase katalysierte Umsetzung des Zugegebenen ECL Substrats in der Dunkelkammer.

#### 6.6.13 Entfernung gebundener Antikörper von Membranen (strippen)

Lösungen: Strippuffer (62,5 mM Tris pH 6,8 2% w/v SDS, 100 mM Beta-Mercaptoethanol frisch zugeben) TBST mit Milchpulver (5% zur Absättigung der Membran, 2,5% für das Ansetzen der Antikörperlösung)

Zur Entfernung von gebundenem Erst- und Zweitantikörper wurde die Membran in einer Schale mit 20 ml Strippuffer für 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe im Abzug inkubiert.

Anschließend wurde der Strippuffer mit H<sub>2</sub>O komplett entfernt und die Membran 1 h in H<sub>2</sub>O , dann 15 min in TBST mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 6.6.14 Gelretardationsexperimente

Lösungen: WCE-Puffer (20 mM HEPES pH 7,9 , 400 mM KCl, 20% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> Proteaseinhibitor Complete und Phosphataseinhibitoren frisch zugeben) 0,25 x TBE (20 mM Tris, 22,25 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA), Oligopuffer (10 mM HEPES pH 7,9 ,10% v/v Glycerin, 1 mM DTT, 0,1 µg / µl poly dI/dC, BSA 0,5 µg / µl) Inkubationspuffer (100 mM Tris 1 mM DTT, 50 mM NaCl), PBS

Ramos B Zellen wurden mit Interleukin-4 stimuliert und bei 700 g für 3 min bei RT im Zentrifugenröhrchen sedimentiert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen in je 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Sie wurden bei 500 g für 1 min bei 4°C in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in geschätztem 5-fachen Zellsedimentvolumen WCE-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert und anschließend mit 20% Intensität für 10 sek im Eisbad im Sonifier von Branson, Danbury mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde bei 21910 g für 10 min bei 4°C geklärt und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde bestimmt, anschließend auf 2 µg / µl eingestellt und die Lysate aliquotiert eingefroren und bei –80°C gelagert.

Markierung der Oligonukleotidsonde:	Ansatz:	2 pmol doppelsträngiges Oligo
		25 µCi γATP
		1 x PNK Puffer in 30 µl
		40 U Polynukleotidkinase

Die Markierung erfolgte bei 37°C für 15 min und wurde nach 15 min durch Zugabe von EDTA 17 mM gestoppt und anschließend mit 20 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. 1 µl des Ansatzes wurde zur Messung der eingesetzten Radioaktivität abgenommen. Die markierten Oligonukleotide wurden in micro Spin G-25, Sepharose Säulen (GE-Healthcare) aufgereinigt und 1 µl des Durchflusses zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität abgenommen. Die Einbaerate der Radioaktivität wurde durch Vergleich der Proben vor und nach Aufreinigung bestimmt und die Aktivität der Oligonukleotidsonde durch verdünnen auf 2 x 10<sup>5</sup> cpm / µl eingestellt.

Herstellung des Gels, Zusammensetzung:	H <sub>2</sub> O	23 ml
	5-fach TBE	1,5 ml
	80% Glycerin	1 ml
	Acrylamidlösung (39:1)	4 ml
	APS 10 %	241 µl
	Temed	18 µl

Je 1 µl Oligonukleotidsonde ( $2 \times 10^5$  cpm / µl) wurde in 10 µl Oligopuffer im Bindeansatz eingesetzt. Pro Probe wurde 4 µl an WCE-Lysat mit 1 µl Inkubationspuffer in 10 µl vorgelegt. Jeweils 10 µl der in Oligopuffer vorgelegten Oligonukleotidsonde und die WCE-Lysate wurden vereinigt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Bindung von STAT6 wurde durch Zugabe von 1 µl STAT6 spezifischem Antikörper kontrolliert (Supershift). Die Elektrophorese erfolgte in 0,25% TBE. Vor Auftragung der Proben erfolgte ein Vorlauf bei 200 V für 15 min. In eine Spur wurden 5 µl an DNA-Probenpuffer zur Kontrolle des Laufs aufgetragen. Der Gellauf der Proben erfolgte bei 200 V für 2-3 h. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit 10% Essigsäure überschichtet 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Gel Trocknung auf dickem Whatmanpapier und anschließende Autoradiographie.

#### 6.6.15 Chromatinimmunpräzipitation

Lösungen: Lysispuffer (50 mM Tris pH 8,1 , 10 mM EDTA pH 8 , 1% w/v SDS  
 Proteaseinhibitor Complete frisch zugeben)  
 Verdünnungspuffer (16,7 mM Tris pH 8,1 , 1,2 mM EDTA pH 8 , 167 mM NaCl,  
 1,1% Triton-x-100 , 0,01% SDS)  
 Niedrigsalzpuffer (20 mM Tris pH 8,1, 2 mM EDTA pH 8 , 150 mM NaCl, 1%  
 Triton-x-100, 0,1% SDS)  
 Hochsalzpuffer (20 mM Tris pH 8,1, 2 mM EDTA pH 8 , 500 mM NaCl, 1%  
 Triton-x-100, 0,1% SDS)  
 Hochsalzpuffer für NCoA-1 und PP2A (20 mM Tris pH 8,1, 2 mM EDTA pH 8 ,  
 250 mM NaCl, 0,25% Triton-X-100)  
 Lithiumchloridpuffer  
 TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,1, 1 mM EDTA pH 8)  
 Elutionspuffer (1% SDS, 100 mM EDTA)

Die Chromatinimmunpräzipitation wurde mit je  $3 \times 10^6$  Ramos B Zellen pro Reaktion durchgeführt. Für die Probenaufarbeitung wurden je  $12 \times 10^6$  Zellen gemeinsam verarbeitet und die Proben anschließend anteilig für die einzelnen Immunpräzipitationen aufgeteilt. Proteine und DNA wurden nach Behandlung für 10 min mit 1% Formaldehyd kovalent vernetzt und die Reaktion durch Zugabe von Glycin auf eine Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Die Zellen wurden im Zentrifugenröhrchen bei 700 g für 3 min bei RT sedimentiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden erneut bei 500 g für 1 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellkerne isoliert (siehe Kernextraktion). Die isolierten Zellkerne wurden in 300 µl SDS-Lysispuffer resuspendiert und durch auf- und abpipettieren gelöst. Anschließend erfolgte die Fragmentierung der DNA durch Ultraschallbehandlung im Branson Sonifier, Danbury für 8 sek bei 30% Intensität auf Eis. Die Lysate wurde bei 21910 g für 10 min bei 4°C geklärt und die Überstände in Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt (zusammen 3 ml für 4 Immunpräzipitationsreaktionen). Für die Normierung wurden je 50 µl als Input abgenommen und auf Eis gelagert. Pro Reaktion wurden 750 µl des Lysats in die Präzipitation mit je 2 µg Antikörper und 10 µl Protein

Agaroseharz (vorher in 3 x Verdünnungspuffer äquilibriert) eingesetzt. Die Immunpräzipitation DNA-gebundener Proteine erfolgte für 6 h bei 4°C auf dem Rotator. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit unspezifischem IgG durchgeführt. Anschließend wurden die Proben je 1 x mit 500 µl Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer (antikörperspezifisch), Liziumchloridpuffer und TE-Puffer für 5 min bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Sedimentation des Harzes erfolgte bei 500 g für 30 sek. bei 4°C. Beim letzten Waschschrift mit TE-Puffer wurden die Proben im TBE Puffer in je ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, um die unspezifisch an die Reaktionsgefäßwand gebundene DNA nicht in die Elutionsreaktion zu übernehmen. Die DNA wurde mit je 100 µl Elutionspuffer für 30 min unter schütteln bei RT eluiert und die Vernetzung der Proteine durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 200 mM bei 65°C über Nacht aufgelöst. Anschließend wurde die eluierte DNA durch das PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Der Nachweis der präzipitierten DNA erfolgte im i-Cycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Biorad) unter Verwendung von Primern.

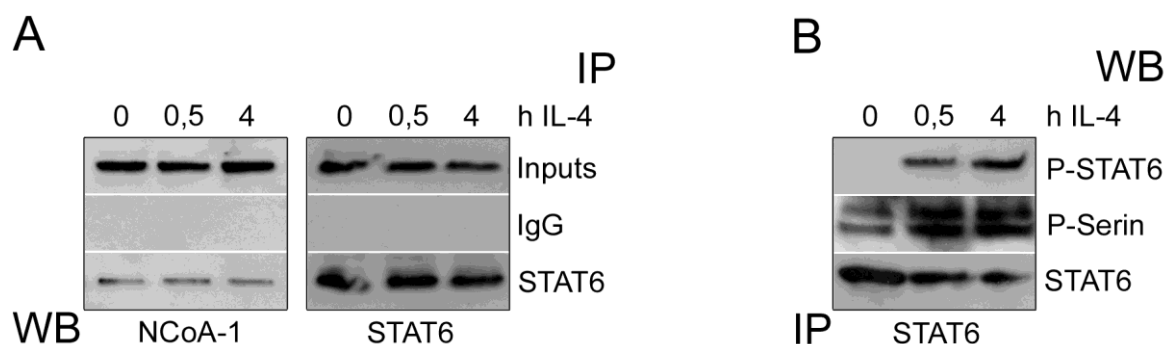
### 6.7 *In-silico*-Untersuchungen und verwendete Programme:

Programm	Verwendung	Internetadresse
Networkin	Vorhersage Phosphorylierungsstellen in NCoA-1	<a href="http://networkin.info/search.php">http://networkin.info/search.php</a>
Primerdesign	Primerdesign zur PCR-basierten Mutagenese	<a href="http://www.stratagene.com/qcprimerdesign">www.stratagene.com/qcprimerdesign</a>

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Untersuchung des Einflusses der IL-4 Stimulation auf die Koaktivatorrekrutierung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des Koaktivatorkomplexes in der STAT6 vermittelten Transkription untersucht werden. Speziell wurde die Regulation der Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 durch Phosphorylierung untersucht. Interleukin-4 (IL-4) führt zur Aktivierung von STAT6 und zur Transkription von STAT6-Zielgenen. Neben der Tyrosinphosphorylierung für die Aktivierung induziert IL-4 überwiegend die Serinphosphorylierung und wenig die Threoninphosphorylierung in der Transaktivierungsdomäne (TAD) von STAT6 (Wick and Berton 2000), an die NCoA-1 bindet (Litterst, Kliem et al. 2003). Die Serinphosphorylierung in der TAD von STAT6 ist die Voraussetzung für die Transkriptionsaktivierung über STAT6 (Pesu, Takaluoma et al. 2000). Daher wurde untersucht, ob die IL-4 induzierte Serinphosphorylierung die Interaktion von STAT6 mit NCoA-1 beeinflusst. Endogenes STAT6 wurde aus Extrakten unbehandelter und mit IL-4 vorbehandelter Ramos B Zellen präzipitiert und anschließend STAT6 und NCoA-1 in den Immunpräzipitationen nachgewiesen. Parallel wurde die Tyrosinphosphorylierung am Tyrosin 641, die charakteristisch für die Aktivierung von STAT6 ist und die Serinphosphorylierung von STAT6 untersucht.



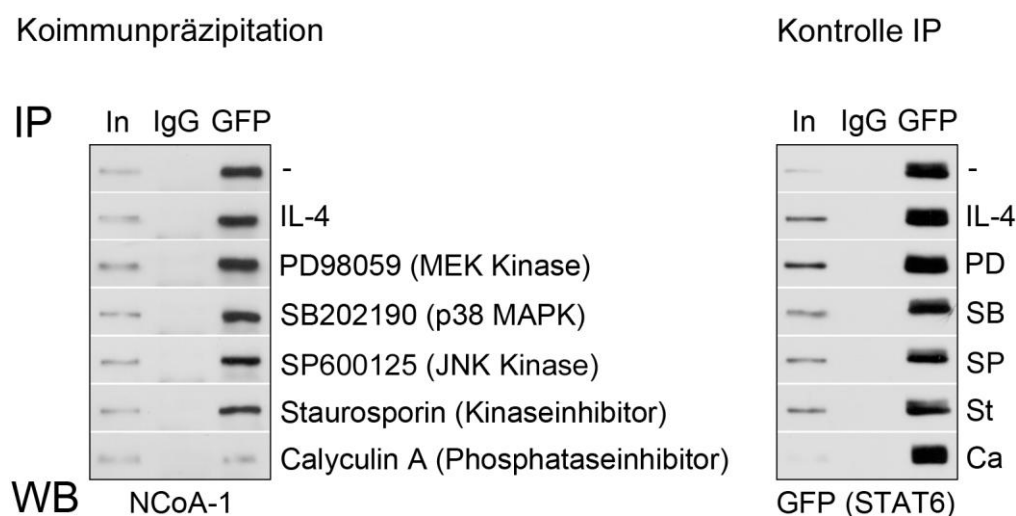
**Abb. 4: Einfluß der IL-4 Stimulation auf die Serinphosphorylierung von STAT6 und die Interaktion von STAT6 mit NCoA-1 in humanen B-Zellen.** A) Ramos B Zellen wurden nicht, bzw. für 0,5 h und 4 h mit IL-4 (10 ng/ml) stimuliert. Aus den NETN-Extrakten der behandelten Zellen wurde STAT6 mit je 4 µg STAT6 spezifischen Antikörper (Santa Cruz M200) präzipitiert. Immunpräzipitiertes STAT6 und kopräzipitiertes NCoA-1 wurden im Westernblot nachgewiesen. Je 3% der in die Interaktionsstudie eingesetzten Proteinmenge wurde als Input aufgetragen. B) Behandlung von Ramos B Zellen wie in A. STAT6 wurde mit 4 µg STAT6 spezifischen Antikörper (Santa Cruz M20) aus 1 mg Protein in NETN-Extrakt präzipitiert, die Serinphosphorylierung von STAT6, die Tyrosinphosphorylierung am Tyrosin 641 und anschließend STAT6 im Westernblot nachgewiesen.

Die Interaktionsstudien zeigen, daß die Bindung von NCoA-1 an STAT6 unabhängig von der IL-4 induzierten Aktivierung und der Serinphosphorylierung von STAT6 ist (Abb. 4A/B). STAT6 wird durch IL-4 nach 0,5 h und 4 h tyrosinphosphoryliert und eine verstärkte Serinphosphorylierung wird induziert (Abb. 4B). Anders als bei den nukleären Hormonrezeptoren, bei denen die intrazelluläre Bindung des Hormons an den Transkriptionsfaktor die Rekrutierung des Transkriptionskoaktivators bewirkt, ist die

Interaktion zwischen STAT6 und NCoA-1 nicht durch die extrazelluläre IL-4 Stimulation reguliert (Abb 4A). Die Funktion der für die Transkriptionsaktivierung wichtigen IL-4 induzierten Serinphosphorylierung besteht demnach nicht in einer veränderten Koaktivatorrekrutierung.

## 7.2 Untersuchung des Beitrags zellulärer Signalwege zur STAT6 / NCoA-1 Interaktion

Neben der Tyrosinphosphorylierung von STAT6 durch IL-4 über die Januskinasen sind weitere Kinasen und PP2A an der STAT6 vermittelten Transkription beteiligt (Deszo, Brake et al. 2004) (Pesu, Aittomaki et al. 2002) (Canfield, Lee et al. 2005) (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Um eine Beteiligung dieser Proteine an der Koaktivatorrekrutierung zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. EGFP markiertes STAT6 und NCoA-1 wurden in Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend behandelt. Die Zellen wurden mit IL-4 (Induzierung der Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT6), PD98059 (MEK Kinase Inhibitor), SB202190 (p38 MAPK Inhibitor), SP600125 (JNK Kinase Inhibitor), Staurosporin (unspezifischer Serin-/Threoninkinaseinhibitor) und Calyculin A (Serin-/Threoninphosphataseinhibitor) behandelt. Präzipitiertes EGFP-STAT6 und kopräzipitiertes NCoA-1 wurden nachgewiesen (Abb. 5).



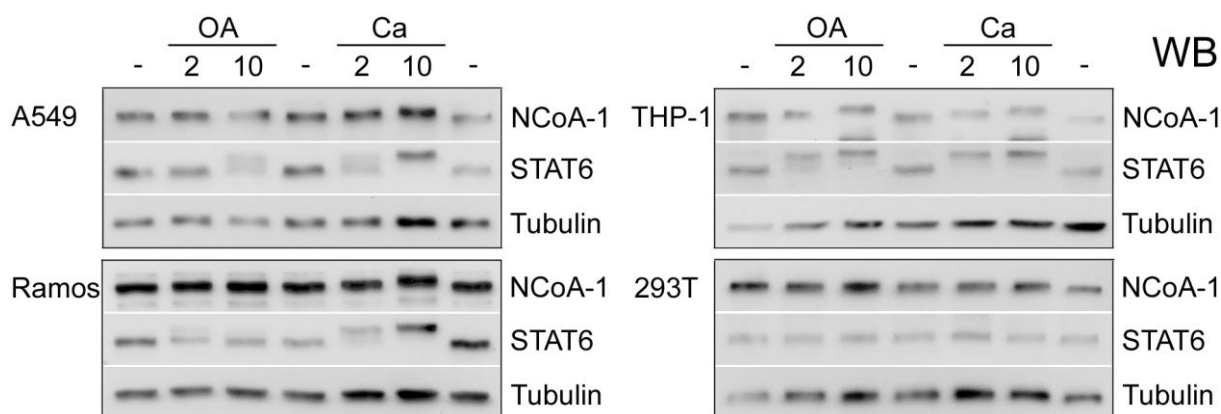
**Abb. 5: Serin-/Threoninphosphatasen regulieren die Interaktion von STAT6 und NCoA-1.** HEK 293T Zellen wurden im 6-loch Maßstab mit je 100 ng EGFP-STAT6 und 500 ng NCoA-1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen für 2 h mit IL-4 (10 ng/ml), PD98059 (50 µM), SB202190 (10 µM), SP600125 (200 nM), Staurosporin (200 nM) und Calyculin A (10 nM) behandelt. Aus den NETN-Extrakten der Zellen erfolgte die Präzipitation von STAT6 durch je 1,5 µg GFP-Antikörper. Immunpräzipitiertes STAT6 und kopräzipitiertes NCoA-1 wurden im Westernblot mit GFP- bzw. NCoA-1 spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Je 2% des in die Interaktionsstudie eingesetzten Proteins wurde als Input eingesetzt.

Durch die Koimmunpräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, daß die spezifischen Inhibitoren für die MEK Kinase, p38 MAP Kinase, oder die JNK Kinase, die die Transkription über STAT6 inhibieren, die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 nicht beeinflussen (Abb. 5). Ebenso beeinflussen weder IL-4, das die Serinphosphorylierung von STAT6 induziert (nicht

gezeigt), noch die Inhibition der Serin-/ Threoninphosphorylierung durch Staurosporin die Interaktion (Abb. 5). Calyculin A, ein Hemmstoff für zelluläre Serin-/Threoninphosphatasen, der ebenfalls die Transkription über STAT6 inhibiert (Woetmann, Brockdorff et al. 2003), vermindert die Interaktion zwischen STAT6 und NCoA-1. Calyculin A inhibiert unter anderem die Serin-/ Threoninphosphatase PP2A, für die bereits eine wichtige Rolle bei der STAT6 vermittelten Transkription beschrieben wurde (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Folglich wurde eine Beteiligung von PP2A an der Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 vermutet.

### 7.3 Untersuchung der Wirkung von Serin-Threoninphosphataseinhibitoren auf die Elektromobilität von NCoA-1

Durch den Nachweis von NCoA-1 aus den Koimmunpräzipitationsexperimenten (KoIP) konnte für NCoA-1 nach Calyculin A Behandlung eine veränderte Elektromobilität im Westernblot beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese kann durch eine Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von Prolin-flankierten Aminosäuren bedingt sein und war bislang nur für STAT6 beschrieben (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Um zu untersuchen, ob eine veränderte Elektromobilität von NCoA-1 Zelltyp spezifisch ist, wurde das Laufverhalten von NCoA-1 aus verschiedenen IL-4 stimulierbaren Zellen und den HEK 293T Zellen nach Behandlung mit Phosphataseinhibitoren untersucht. Humane A549, Ramos, THP-1 und HEK 293T Zellen wurden jeweils mit den Serin-/ Threoninphosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A behandelt. Anschließend wurden NCoA-1 und STAT6 nachgewiesen.



**Abb. 6: Serin-/ Threoninkinaseinhibitoren verändern die Elektromobilität von STAT6 und NCoA-1 aus IL-4 induzierbaren Zellen.** Humane A549, Ramos, THP-1 und HEK 293T wurden je mit 2 nM und 10 nM Okadasäure und Calyculin A für 2 h behandelt oder unbehandelt gelassen. Der Nachweis im Westernblot erfolgte mit STAT6 und NCoA-1 spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde Tubulin nachgewiesen.

In den untersuchten Zelllinien wurden konzentrations- und inhibitorspezifisch veränderte Elektromobilitäten von STAT6 und seinem Transkriptionskoaktivator NCoA-1 beobachtet (Abb. 6). Calyculin A induziert die Veränderung der Elektromobilität effektiver als Okadasäure. In der Literatur wurde beschrieben, daß Calyculin A schneller als Okadasäure in die Zellen gelangt. Neben den Inhibitor spezifischen Effekten konnte gezeigt werden, daß



die Laufgeschwindigkeit von STAT6 allgemein stärker verändert wird als die von NCoA-1. Darüber hinaus konnten zelltypspezifische Unterschiede bei der Intensität der Veränderung der Laufgeschwindigkeit festgestellt werden. Da die veränderte Elektromobilität durch Phosphataseinhibitoren induziert wurde, wurde eine durch Phosphataseinhibitoren induzierte Hyperphosphorylierung von STAT6 und NCoA-1 vermutet.

#### 7.4 STAT6 und NCoA-1 liegen in humanen B-Zellen nach Phosphataseinhibitorbehandlung hyperphosphoryliert vor

STAT6 wird durch IL-4 tyrosin- und serinphosphoryliert (Pesu, Takaluoma et al. 2000) bzw. nach Calyculin A Behandlung serinphosphoryliert (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Zur Klärung, ob die veränderte Elektromobilität von STAT6 und NCoA-1 mit verstärkter Phosphorylierung einhergeht, wurde die Phosphorylierung von STAT6 und NCoA-1 mittels radioaktiver metabolischer Markierung von Zellen untersucht. Der Nachweis von Aminosäure spezifischen Phosphorylierungen, die eine Unterscheidung zwischen Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierung ermöglicht, wurde mit spezifischen Antikörpern versucht (nicht gezeigt). Da mit diesen Antikörpern keine verlässlichen Ergebnisse erzielt wurden, wurde die metabolische radioaktive Markierung mit  $P^{32}$  Phosphorsäure durchgeführt. Bei dieser wird zum Nachweis von posttranslationalen Modifikationen das radioaktiv markierte Phosphat *in vivo* eingebaut und anschließend die eingebaute Radioaktivität in den Proteinen von Interesse nach Immunpräzipitation detektiert.

Es sollte untersucht werden, ob neben STAT6 auch NCoA-1 durch IL-4 Stimulation phosphoryliert wird, und ob Calyculin A eine Hyperphosphorylierung von NCoA-1 bewirkt. Humane BJAB B Zellen, die ein hohes endogenes Expressionslevel an NCoA-1 aufweisen, wurden mit radioaktivem  $P^{32}$  metabolisch markiert. Die Zellen wurden mit IL-4, mit Calyculin A, mit IL-4 und Calyculin A, sowie mit Calyculin A und dem unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin behandelt. Anschließend wurden NCoA-1 und STAT6 nacheinander immunpräzipitiert.



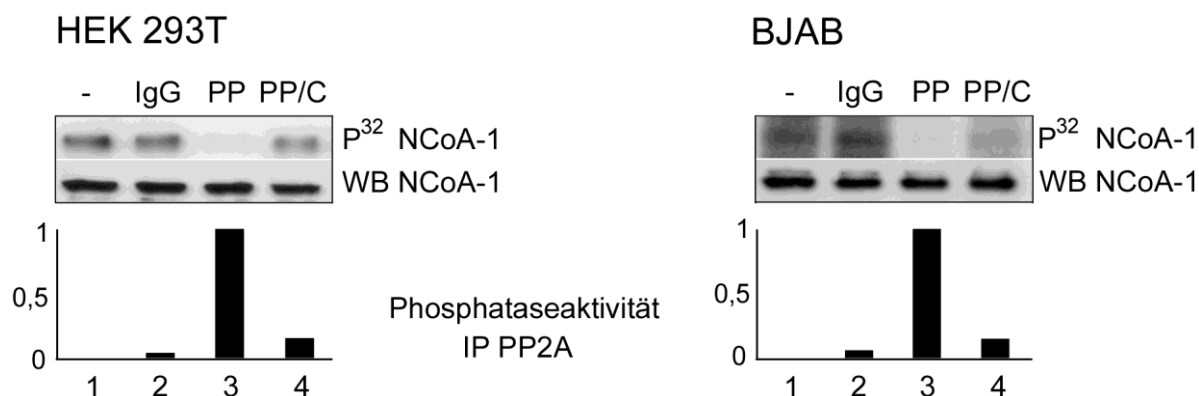
**Abb. 7: Calyculin A Behandlung von humanen BJAB B Zellen induziert Hyperphosphorylierung von STAT6 und NCoA-1.** A)  $2 \times 10^7$  BJAB Zellen wurden je mit 0,5 mCi  $P^{32}$  Orthophosphat markiert und anschließend zwei Stunden mit IL-4 und/ oder Calyculin A, bzw. mit Calyculin A nach Staurosporinvorbehandlung für 30 min behandelt. STAT6 und NCoA-1 wurden mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und in die SDS-PAGE eingesetzt. 95% des präzipitierten STAT6 und NCoA-1 wurden in die Autoradiographie eingesetzt. 5% der Proben wurden auf ein separates Gel zur Kontrolle der Immunpräzipitation der Proteine eingesetzt.

Durch die IL-4 Behandlung konnte die in der Literatur bereits beschriebene Induktion der Phosphorylierung von STAT6 bestätigt werden (Abb. 7). Dies ist zu erwarten, da STAT6 durch IL-4 tyrosinphosphoryliert wird und IL-4 darüber hinaus die Serinphosphorylierung der Transaktivierungsdomäne induziert. Die Behandlung mit Calyculin A führt zu erhöhter Phosphorylierung von STAT6 auch ohne IL-4 Stimulation. Dies lässt auf IL-4 unabhängige, konstitutive Phosphorylierungsereignisse von STAT6 schließen. Durch die kombinierte Behandlung mit IL-4 und Calyculin A wurde eine verstärkte Phosphorylierung von STAT6 induziert. Die IL-4 unabhängige und IL-4 abhängige Phosphorylierung verbleiben durch Hemmung von Phosphatasen im Protein und führen zu einem erhöhten Phosphorylierungslevel.

Da Calyculin A Serin-/ Threoninphosphatasen hemmt, ist überwiegend von einer verstärkten Serin-/ Threoninphosphorylierung auszugehen. Durch die Vorinkubation der Zellen mit dem unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin kann die Calyculin A vermittelte verstärkte Phosphorylierung inhibiert werden. Im Gegensatz zu STAT6 hat IL-4 keinen Einfluß auf das Phosphorylierungslevel von NCoA-1. Wie bei STAT6 führt bei NCoA-1 die Inkubation der Zellen mit Calyculin A zu einer durch Staurosporin hemmbaren Hyperphosphorylierung. Diese ist unabhängig von der IL-4 Stimulation. Auch bei NCoA-1 korreliert die verstärkte Phosphorylierung mit der veränderten Elektromobilität (Abb.7).

## 7.5 NCoA-1 ist Substrat von endogenem PP2A

PP2A konnte bereits als für die STAT6 vermittelte Transkription essentielle Phosphatase charakterisiert werden (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Da NCoA-1 nach Calyculin A Behandlung hyperphosphoryliert vorliegt, wurde untersucht ob NCoA-1 ein Substrat von PP2A ist. Die katalytische Untereinheit von PP2A wurde mittels spezifischer Immunpräzipitation aus Gesamtzelllysat gewonnen und in die *in vitro* Dephosphorylierung eingesetzt. Der verwendete Antikörper ist gegen den C-terminalen Teil der katalytischen Untereinheit gerichtet und verdeckt daher im gebundenen Zustand das katalytische Zentrum des Enzyms nicht. Überexprimiertes NCoA-1 aus Extrakten radioaktiv markierter Zellen wurde als Substrat eingesetzt. Die Extrakte wurden in vier gleiche Teile aufgeteilt. Als Kontrolle für die Spezifität der Dephosphorylierung wurde eine der beiden PP2A behandelten Proben mit Calyculin A versetzt. Nach der Dephosphorylierungsreaktion wurde NCoA-1 immunpräzipitiert. NCoA-1 konnte durch immunpräzipitiertes PP2A aus beiden Zelllinien dephosphoryliert werden (Abb. 8). In der unbehandelten Kontrolle (Spur 1) und nach Behandlung mit der IgG Immunpräzipitation (Spur 2) kann keine Dephosphorylierung festgestellt werden, wohingegen die präzipitierte PP2A NCoA-1 dephosphoryliert (Spur 3).



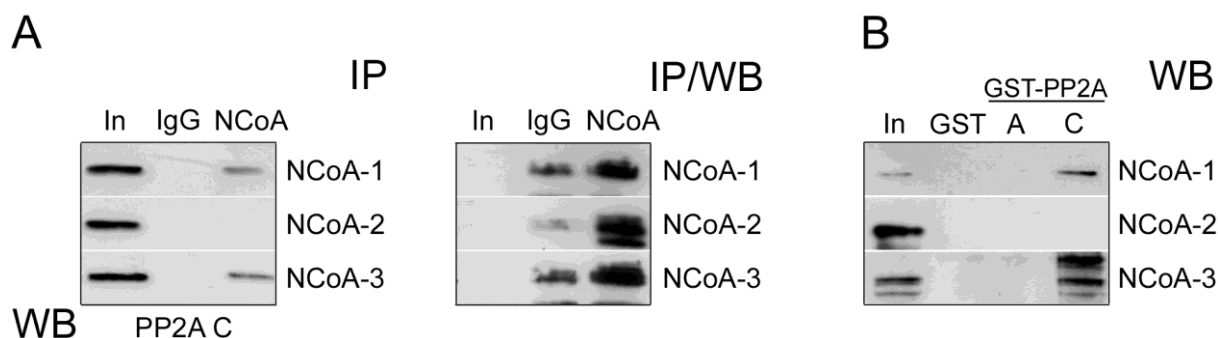
**Abb. 8: *In vitro* Dephosphorylierung von NCoA-1 durch PP2A.** 10 cm Schalen HEK 293T (transfiziert mit 3 µg NCoA-1) und 6 x 10<sup>7</sup> BJAB Zellen (endogenes NCoA-1) wurden mit 0,5 mCi P<sup>32</sup>Orthophosphat radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten Zellen wurden 10 min mit Calyculin A (10 nM) behandelt und NETN-Extrakte hergestellt. Die Extrakte wurden in vier gleiche Teile aufgeteilt und diese unterschiedlich für 1 h bei 37°C behandelt. Für die Behandlung der vier Proben wurde aus je 250 µg NETN Zelleextrakt von unmarkierten Zellen HEK 293T und BJAB zweimal PP2A mit 2 µg spezifischem Antikörper präzipitiert. Parallel wurde je eine Präzipitation mit unspezifischem IgG durchgeführt. Die Extrakte mit den radioaktiv markierten Proteinen wurden mit der immunpräzipitierten PP2A, bzw. der Kontrollpräzipitation behandelt. Spur 1: unbehandelt, Spur 2: Behandlung mit Kontrollpräzipitation, Spur 3: Behandlung mit der präzipitierten PP2A. Spur 4: wie Spur 3 unter Zugabe von 10 nM Calyculin A. Inkubation für je 1 h bei 37°C. Nach der Behandlung wurde NCoA-1 aus den Extrakten mit je 2 µg Antikörper präzipitiert und in Autoradiographie und Westernblot nachgewiesen. Die gebundene Phosphataseaktivität aus den Präzipitationen wurde im Anschluß an die Lysatbehandlung im Phosphataseassay gemessen.

Durch die Inaktivierung von PP2A mittels Calyculin A kann die PP2A vermittelte Dephosphorylierung inhibiert werden (Spur 4). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß sowohl überexprimiertes (aus HEK 293T Zellen), als auch endogenes (aus BJAB Zellen) NCoA-1 ein Substrat von endogener, präzipitierter PP2A ist.

## 7.6 NCoA-1 und NCoA-3 binden an die katalytische Untereinheit von PP2A

Als identifiziertes Substrat von PP2A wurde die Bindung von NCoA-1 und den anderen NCoA Proteinen an PP2A in CoIP und GST-Pulldown Experimenten untersucht. Da die Familienmitglieder der NCoA Proteine hohe Sequenzhomologien aufweisen und für NCoA-3 bereits eine Regulation durch PP2A in der Literatur gezeigt werden konnte, wurde die Spezifität der Interaktion der NCoA Proteine mit PP2A untersucht. NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 wurden aus Gesamtzellextrakten präzipitiert und die katalytische Untereinheit von PP2A in den Immunpräzipitaten nachgewiesen.

Zur Untersuchung der Interaktion von NCoA-1 mit den isolierten Untereinheiten von PP2A wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Die Bindung von NCoA-1 an die regulatorische Untereinheit konnte nicht untersucht werden, da die potentiell an NCoA-1 bindende regulatorische Untereinheit von PP2A nicht bekannt ist.

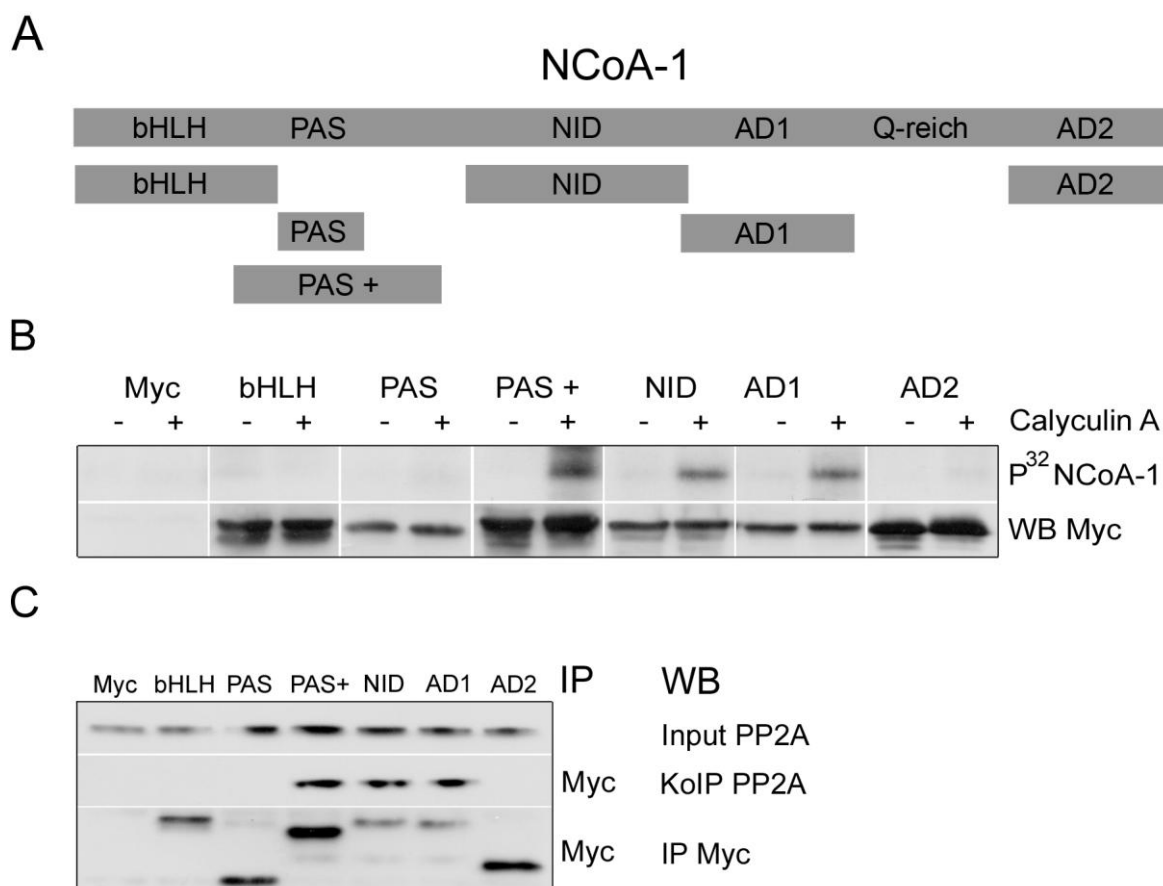


**Abb. 9: NCoA-1 und NCoA-3 binden an die katalytische Untereinheit von PP2A.** A) NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 wurden aus NETN-Extrakt von BJAB Zellen mit je 4 µg spezifischem Antikörper präzipitiert. Immunpräzipitierte NCoAs und kopräzipitierte PP2A C wurden im Westernblot nachgewiesen. Je 2% des in der Bindungsstudie eingesetzten Proteins wurden als Input aufgetragen. B) Je 250 µg NETN-Extrakt wurde mit je 5 µg GST-fusioniertem PP2A A und PP2A C Untereinheiten im Pulldown inkubiert. Gebundene NCoA Proteine wurden nach SDS-PAGE im Westernblot nachgewiesen. Je 1% des in der Bindungsstudie eingesetzten Proteins wurde als Input aufgetragen.

In den KoIP Experimenten konnte PP2A an NCoA-1 und an NCoA-3 kopräzipitiert werden, wohingegen NCoA-2 PP2A C nicht kopräzipitiert (Abb. 9A). Darüber hinaus konnte durch die GST-Pulldown Experimente gezeigt werden, daß NCoA-1 und NCoA-3 spezifisch mit der katalytischen Untereinheit interagieren (Abb. 9B). Durch die Interaktionsstudien wird deutlich, daß trotz hoher Sequenzähnlichkeit speziell die an der STAT6 vermittelten Transkription beteiligten NCoA-1 und NCoA-3 mit PP2A interagieren.

## 7.7 Identifikation der Regionen von NCoA-1, die von PP2A reguliert werden

Um zu analysieren, welche Bereiche von NCoA-1 durch Calyculin A Behandlung hyperphosphoryliert werden, wurden funktionelle Domänen von NCoA-1 verwendet. Diese wurden in Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend metabolisch radioaktiv markiert. Jeweils eine von zwei Proben wurde mit Calyculin A behandelt, um eine mögliche Hyperphosphorylierung der entsprechenden Domäne zu induzieren. Über den fusionierten Myc-Tag wurden die NCoA-1 Fragmente aus den Gesamtzellextrakten präzipitiert. Um die Interaktion mit PP2A nachzuweisen, wurden die identischen Regionen in Zellen überexprimiert, über den fusionierten Myc-Tag präzipitiert und die kopräzipitierte PP2A nachgewiesen. Speziell die NID für die Interaktion mit den nukleären Hormonrezeptoren, die erweiterte mit STAT6 interagierende Region der PAS Domäne, sowie die AD1, welche die Interaktion mit CBP vermittelt, werden durch die Calyculin A Behandlung hyperphosphoryliert (Abb. 10B). Der mit STAT6 interagierende Minimalbereich der PAS Domäne (Razeto, Ramakrishnan et al. 2004), wird nicht Calyculin A induziert hyperphosphoryliert. Auch die N-terminal liegende bHLH, sowie die C-terminal liegende AD2 werden nicht hyperphosphoryliert.



**Abb. 10: Hyperphosphorylierung der NCoA-1 Fragmente nach Calyculin A Behandlung und Nachweis der Interaktion mit PP2A** . A) Schematische Übersicht der im Experiment verwendeten funktionellen Domänen von NCoA-1 B) Identifikation der Calyculin A induzierten hyperphosphorylierten Bereiche von NCoA-1. 6 cm Schalen HEK 293T Zellen wurden mit den Myc-markierten funktionellen Domänen von NCoA-1 transfiziert: Myc Leervektor 1,5 µg, bHLH (AS1-260) 1 µg, PAS (AS 260-370) 1 µg, PAS + (AS 213-462) 0,3 µg, NID (AS 596-805) 1 µg, AD1 (AS 804-1032) 1,5 µg, AD2 (AS 1258-1441) 0,3 µg. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit 0,1 mCi  $P^{32}$  Orthophosphat radioaktiv markiert und je eine Schale mit Calyculin A (10 nM) für zwei Stunden behandelt. Aus NETN-Extrakten wurden die NCoA-1 Fragmente mit je 2 µg gegen Myc gerichteten Antikörper präzipitiert und anschließend in der Autoradiographie und im Westernblot nachgewiesen C) Identifikation der mit PP2A interagierenden Bereiche von NCoA-1. HEK 293T Zellen in 6-loch Format wurden mit jeweils 50% der in B) verwendeten DNA-Mengen an Myc-markierten Fragmenten von NCoA-1 transfiziert. Aus den NETN-Extrakten (je 100 µg) wurden die NCoA-1 Fragmente mit je 2 µg Myc spezifischem Antikörper präzipitiert, und NCoA-1 Fragmente und kopräzipitierte PP2A nachgewiesen. Als Input wurden je 0,5% aufgetragen.

Aus den Ergebnissen wird klar, daß speziell die Bereiche hyperphosphoryliert werden, die für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und mit dem Transkriptionskoaktivator CBP essentiell sind. Zusammen mit der Beobachtung, daß PP2A speziell an die hyperphosphorylierten Bereiche bindet wird klar, daß PP2A potentiell ein essentieller Regulator für die Funktion von NCoA-1 als Transkriptionskoaktivator ist.

### 7.8 Die Inhibition von Serin-/Threoninphosphatasen inhibiert die Interaktion von endogenem STAT6 und NCoA-1

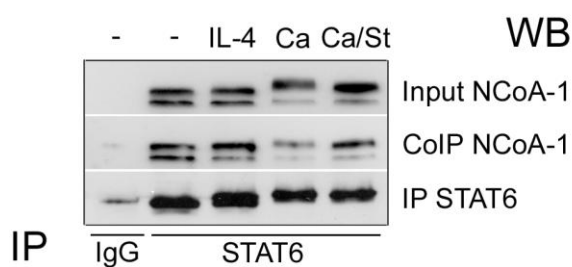
In KoIP Experimenten konnte mit überexprimiertem STAT6 und NCoA-1 die Interaktion von STAT6 mit NCoA-1 durch Calyculin A inhibiert werden (Abb. 5). Um die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 aus einem IL-4 induzierbaren Zellsystem mit endogenen Proteinen zu untersuchen, wurden Ramos B Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit IL-4 stimuliert, mit Calyculin A oder mit Calyculin A zusammen mit Staurosporin behandelt, anschließend

STAT6 aus den Gesamtzelllysaten präzipitiert und NCoA-1 in den Immunpräzipitaten nachgewiesen.

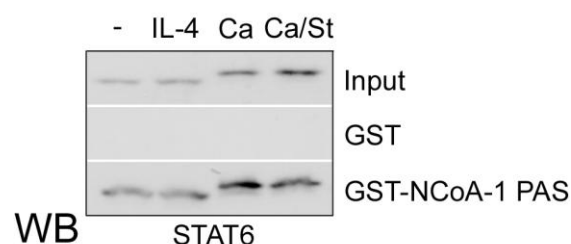
Die KoIP Experimente aus Ramos B Zellen bestätigen die Calyculin A induzierte Hemmung der Interaktion von STAT6 und NCoA-1 auch unter Verwendung endogener Proteine (Abb. 11A). Die parallele Behandlung mit Staurosporin, die die Hyperphosphorylierung von NCoA-1 revertiert (Abb. 7), revertiert auch die verringerte Affinität von STAT6 und NCoA-1 (Abb. 11A). Ein Einfluß durch IL-4 auf die Interaktion konnte auch in diesem stark IL-4 stimulierbaren Zellsystem nicht gezeigt werden.

Nach Calyculin A Behandlung liegen NCoA-1 und STAT6 hyperphosphoryliert vor (Abb. 7) und interagieren schwächer (Abb. 5). Es kann aber nicht untersucht werden, ob die Phosphorylierung von STAT6 oder von NCoA-1 die Interaktion reguliert, da beide hyperphosphoryliert vorliegen. Um dieses Problem zu umgehen wurde jeweils einer der Interaktionspartner als unmodifiziertes heterolog exprimiertes GST-Fusionsprotein im GST-Pulldown in die Interaktionsstudie vorgelegt.

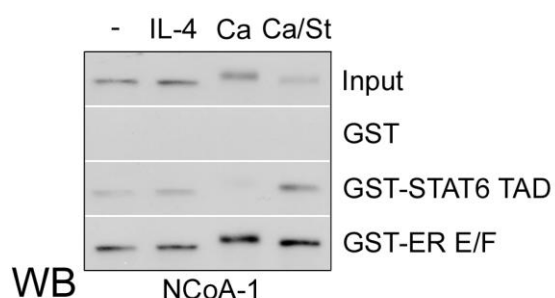
## A Koimmunpräzipitation



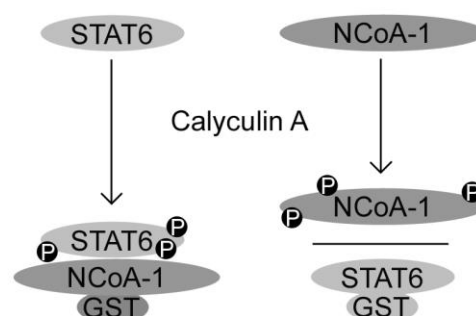
## B Pulldown



## B Pulldown



## C



**Abb. 11: Calyculin A inhibiert die Interaktion zwischen endogenem STAT6 und NCoA-1 durch Hyperphosphorylierung von NCoA-1.** A) Ramos B Zellen wurden für 2 h mit IL-4 10 ng/µl, Calyculin A 10 nM (Spur Ca), Calyculin A mit 30 min Vorbehandlung mit Staurosporin 200 nM (Spur Ca/St) oder verblieben unbehandelt. STAT6 wurde mit je 4 µg STAT6 spezifischem Antikörper aus den NETN Lysaten der Zellen immunpräzipitiert und STAT6, sowie das kopräzipitierte NCoA-1 im Westernblot nachgewiesen. Je 2% des in die Interaktionsstudie eingesetzten Proteins wurde als Input eingesetzt. B) Ramos B Zellen wurden wie in A) behandelt. Die NETN-Extrakte wurden mit 5 µg GST (Negativkontrolle) und GST-NCoA-1 PAS und 5 µg GST und GST-STAT6 Transaktivierungsdomäne bzw. GST ER E/F Domäne inkubiert. Gebundenes STAT6 (Pulldown an GST-NCoA-1 PAS) und NCoA-1 (Pulldown an GST-STAT6-TAD) wurden nach SDS-PAGE im Westernblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Je 10% der in die Interaktionsstudie eingesetzten Proteinmenge wurden als Input eingesetzt. C) Schematische Darstellung Calyculin A induzierter Inhibition der Interaktion von NCoA-1 und STAT6 durch Hyperphosphorylierung von NCoA-1.

Für die Untersuchung des Einflusses der Hyperphosphorylierung des endogenen NCoA-1 wurde die an GST fusionierte Transaktivierungsdomäne von STAT6 und der mit NCoA-1 interagierende Teil des Östrogenrezeptors (Domänen E/F) verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung des endogenen STAT6 wurde die an GST fusionierte PAS Domäne von NCoA-1 vorgelegt.

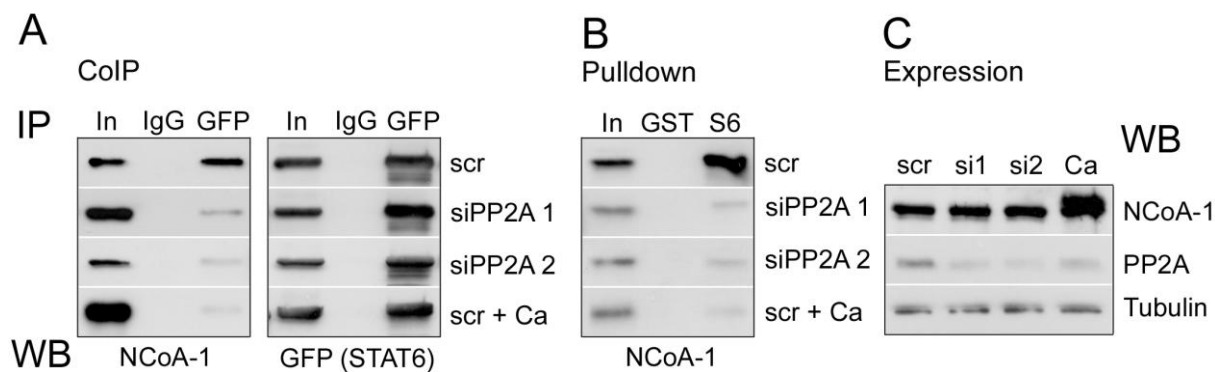
Die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von STAT6 inhibiert nicht die Interaktion von STAT6 mit der unmodifizierten PAS Domäne von NCoA-1 im GST Pulldown (Abb. 11B). Die IL-4 Stimulation reguliert auch im GST Pulldown nicht die Interaktion von STAT6 mit NCoA-1. Durch die Verwendung der unmodifizierten TAD von STAT6 konnte gezeigt werden, daß durch die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung des endogenen NCoA-1 die Interaktion mit STAT6 inhibiert wird (Abb. 11B). Auch im GST Pulldown wird die Schwächung der Bindung von NCoA-1 an STAT6 durch Staurosporin revertiert. Die Bindung von NCoA-1 an den Östrogenrezeptor wird leicht durch die Hyperphosphorylierung verstärkt. Hieraus wird klar, daß die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von NCoA-1 unterschiedliche Effekte auf die Rekrutierung an unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bewirkt.

Im GST-Pulldown konnte durch die Vorlage von bakteriell hergestellten, unmodifizierten GST-Proteinen gezeigt werden, daß weder die IL-4 induzierte, physiologische Phosphorylierung, noch die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von STAT6 die Rekrutierung von NCoA-1 reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von NCoA-1 zu einer Hemmung der Interaktion mit STAT6 führt (Abb. 11B/C).

## **7.9 PP2A reguliert die Interaktion von STAT6 und NCoA-1**

Da bereits gezeigt werden konnte, daß PP2A NCoA-1 dephosphoryliert (Abb. 8), sollte untersucht werden, ob speziell PP2A die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 reguliert. Die Expression von PP2A wurde mittels siRNA (small interfering RNA) verringert. EGFP-STAT6 und NCoA-1 wurden in Zellen überexprimiert und STAT6 präzipitiert. Für den Vergleich mit dem siRNA Knockdown wurde eine Probe mit Calyculin A behandelt. NCoA-1 wurde in den Immunpräzipitaten nachgewiesen. Die verringerte Expression von PP2A C und die Elektromobilität von NCoA-1 wurden separat kontrolliert.

Um spezifisch den Einfluß der Hyperphosphorylierung von NCoA-1 durch PP2A Knockdown zu untersuchen, wurde ein GST-Pulldown durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie im KoIP Experiment behandelt. Die Gesamtzellsate wurden in den GST-Pulldown mit GST-fusionierter STAT6 TAD eingesetzt. An die STAT6 TAD gebundenes NCoA-1 wurde nachgewiesen.



**Abb. 12: Knockdown von PP2A und Calyculin A Behandlung inhibieren die Interaktion von STAT6 und NCoA-1.** A) HEK 293T Zellen in 10 cm Schalen wurden mit 10 nM unspezifischer (scr) oder mit verschiedenen PP2A-spezifischen siRNAs (si1/ 2) transfiziert und 24 h später mit je 1 µg EGFP-STAT6 und 2 µg NCoA-1 transfiziert. Eine Schale wurde 2 h mit Calyculin A 10 nM behandelt. Aus je 500 µg der NETN-Extrakte der Zellen wurde EGFP-STAT6 mit je 4 µg GFP-Antikörper präzipitiert. Präzipitiertes STAT6 und kopräzipitiertes NCoA-1 wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Jeweils 2% wurden als Ladekontrolle aufgetragen. B) Behandlung von HEK 293T Zellen wie in A) aber ohne Transfektion von EGFP-STAT6. 500 µg NETN-Proteinextrakt wurde mit je 5 µg an Glutathion-Sephrose gekoppeltem GST oder mit GST-STAT6 TAD inkubiert. Gebundenes NCoA-1 wurde im Westernblot nachgewiesen. Je 10% wurden als Ladekontrolle aufgetragen.

Durch die Protein/ Protein Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 durch die Serin-/Threoninphosphatase PP2A reguliert wird. Der spezifische Knockdown von PP2A durch siRNAs zeigt dabei den gleichen Effekt wie die Inhibition von PP2A durch Calyculin A (Abb. 12A/B). In den GST-Pulldowns mit unmodifizierter GST-STAT6 TAD konnte bestätigt werden, daß die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 vom PP2A regulierten Zustand von NCoA-1 abhängt (Abb. 12B). Durch die Verringerung der Phosphataseaktivität durch spezifischen Knockdown von PP2A C (Abb. 12C) wird vermutlich wie durch die Behandlung mit Calyculin A eine Hyperphosphorylierung in NCoA-1 induziert. Diese führt interessanterweise nicht wie die Calyculin A Behandlung zu einer veränderten Elektromobilität von NCoA-1 (Abb. 12C), aber zu einer Inhibition der STAT6/ NCoA-1 Interaktion.

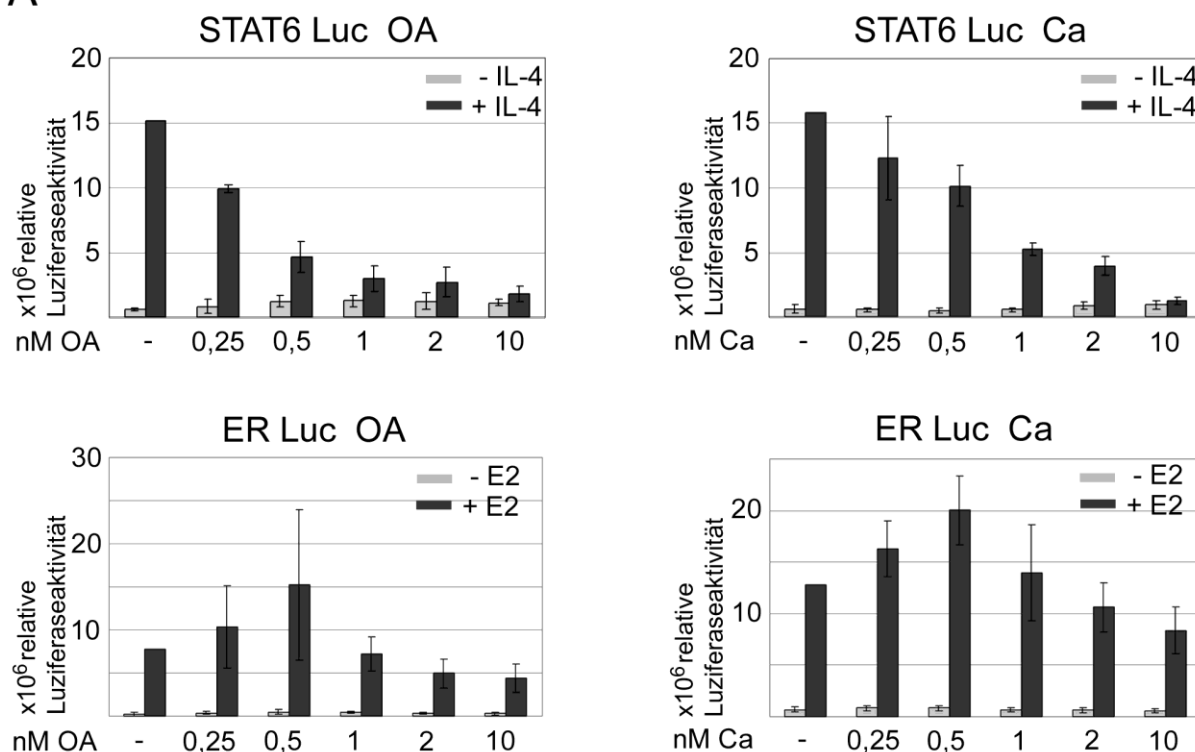
Möglicherweise inhibiert Calyculin A die PP2A Aktivität effektiver als der spezifische Knockdown von PP2A durch siRNAs. Darüber hinaus hemmt Calyculin A auch PP1, für die allerdings in der Literatur bislang kein Einfluß auf die STAT6 vermittelte Genexpression beschrieben wurde. Wesentlich ist aber, daß in diesem Experiment eine Regulation der STAT6/ NCoA-1 Interaktion durch PP2A gezeigt werden konnte.

### 7.10 Die Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A hemmen die STAT6 vermittelte Transkription

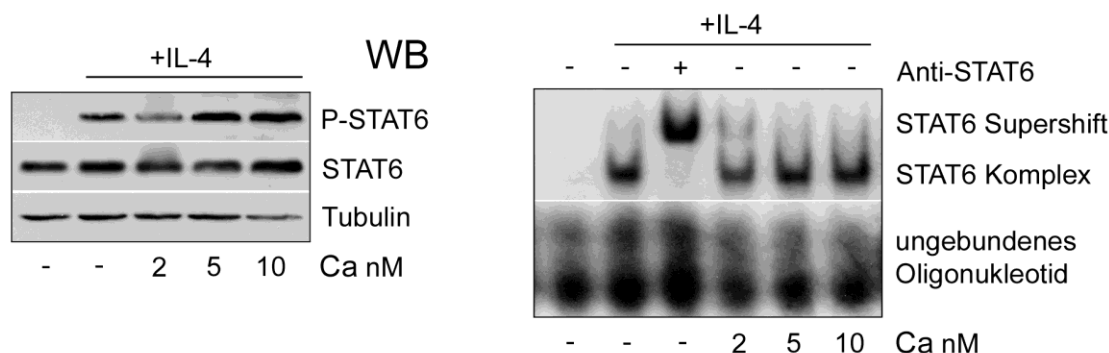
Zur Untersuchung des Einflusses der NCoA-1 Hyperphosphorylierung auf die STAT6 vermittelte Transkription wurden Reportergenexperimente durchgeführt. Zellen wurden mit einem STAT6 Reportergenkonstrukt und dem Wildtyp STAT6 transfiziert. Da PP2A und die durch die Inhibitoren ebenfalls inhibierte Phosphatase PP1 an zahlreichen Dephosphorylierungsvorgängen in der Zelle beteiligt ist, wurde der Einfluß von Okadasäure und Calyculin A im Vergleich auf die Östrogenrezeptor vermittelte Transkription untersucht.



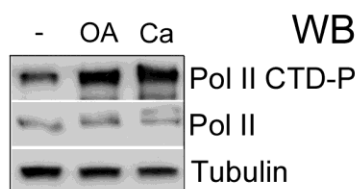
A



B



C



**Abb. 13: Phosphataseinhibitoren reduzieren die STAT6-vermittelte Transkription ohne Hemmung der Aktivierung oder DNA-Bindung von STAT6.** A) HEK 293T Zellen wurden in 24 Loch Platten mit jeweils 100 ng Reporterplasmid E4 TK-Luc, 50 ng STAT6, 5 ng SV40  $\beta$ Gal und 10 ng GFP kodierendem Vektor transfiziert. Für die Untersuchung der Östrogenrezeptor getriebenen Transkription wurden HEK 293T Zellen in 24 Loch Platten in gestripptem Serum in phenolrotfreiem Medium ausgesät und nach 24 h mit je 500 ng Reportervektor pGL2-ERE TK-Luc, 5 ng Östrogenrezeptor, 5 ng SV40  $\beta$ Gal, und 10 ng GFP kodierendem Vektor transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen für 8 h mit IL-4 (10 ng / ml) zur Aktivierung von STAT6, bzw. ü. N. mit Östrogen ( $10^{-7}$ M) zur Aktivierung des Östrogenrezeptors behandelt. Parallel wurden die Zellen in ansteigenden Konzentrationen an Okadasäure oder Calyculin A behandelt. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus jeweils drei biologisch unabhängigen Experimenten und sind über den Wert der induzierten Probe ohne Inhibitorbehandlung normiert. B) Untersuchung der STAT6 Aktivierbarkeit und DNA-Bindung unter Calyculin A Behandlung. HEK 293T wurden in 10 cm Schalen mit je 2  $\mu$ g STAT6 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit IL-4 und mit IL-4 in Kombination mit Calyculin A in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h inkubiert. Die WCE-Lysate wurden im Westernblot zum Nachweis von aktiviertem STAT6 eingesetzt. Im Gelretardationsexperiment wurde STAT6 auf die DNA-Bindung an die STAT6 Bindestelle aus dem Ig-Epsilon Promotor eingesetzt. Die Anwesenheit von STAT6 im DNA-bindenden Komplex wurde mit einem STAT6 spezifischen Antikörper durch Supershift bestätigt. C) Untersuchung der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II. HEK 293T Zellen wurden 2 h mit je 2 nM Okadasäure oder Calyculin A behandelt und anschließend die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase in NETN-Extrakten aus den behandelten Zellen mit einem spezifischen Antikörper im Westernblot untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin detektiert.

Okadasäure und Calyculin A inhibieren die STAT6 vermittelte Transkription konzentrationsabhängig. Die Östrogenrezeptor vermittelte Transkription wird dagegen in niedrigen Konzentrationen erhöht (Abb. 13A). Calyculin A und Okadasäure hemmen PP1 und PP2A konzentrationsabhängig. Während Okadasäure in geringer Konzentration vorwiegend PP2A inhibiert ( $IC_{50} = 0,2 \text{ nM}$ ) (Cohen, Holmes et al. 1990), inhibiert Calyculin A in niedriger Konzentration vorwiegend PP1 ( $IC_{50} = 0,5 \text{ nM}$ ). Die STAT6 vermittelte Transkription wird im Reportergenversuch bereits durch  $0,5 \text{ nM}$  Okadasäure inhibiert, einer Konzentration die vorwiegend PP2A hemmt. Eine vergleichbare Hemmung durch Calyculin A tritt erst bei 1 bis  $2 \text{ nM}$  ein. Eine Hemmung von PP1, die bereits bei niedrigeren Konzentrationen von Calyculin A erwartet wird, hat wenig Einfluß auf die Transkriptionsaktivierung (Abb. 13A).

Für die Transkriptionsaktivierung über STAT6 ist ein tyrosinphosphoryliertes und somit aktiviertes, DNA-bindendes STAT6 Voraussetzung. In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, daß die Calyculin A induzierte Serinphosphorylierung der TAD die DNA-Bindung von STAT6 hemmt, obwohl die für die Dimerisierung wichtige Tyrosinphosphorylierung nicht gehemmt wird (Maiti, Sharma et al. 2005) (Wick and Berton 2000). In den erwähnten Arbeiten wurden hohe Konzentrationen von Calyculin A ( $80 \text{ nM}$ ) verwendet.

Um auszuschließen, daß die Inhibitor spezifischen Effekte in den Reportergenexperimenten durch die Hemmung der Aktivierung oder der DNA-Bindung von STAT6 bedingt sind, wurden die Tyrosinphosphorylierung und die DNA-Bindung von STAT6 nach IL-4 Behandlung unter Calyculin A Einfluß untersucht.

Die Aktivierung von STAT6 aus Gesamtzellextrakten wurde im Westernblot und parallel die DNA-Bindung in Gelretardationsexperimenten untersucht. Die Aktivierung von STAT6 wird durch Calyculin A nicht gehemmt (Abb. 13B). Die für die Untersuchung der Aktivierung von STAT6 im Westernblot verwendeten Konzentrationen an Calyculin A befinden sich im gleichen Bereich wie im Reportergenexperiment. Eine Hemmung der STAT6 Aktivierung durch Phosphataseinhibitoren ist somit nicht die Grundlage für die im Reportergenassay gefundenen Inhibitor abhängigen Effekte. Die DNA-Bindung von STAT6 wird im Gelretardationsexperiment ebenfalls nicht durch die Behandlung der Zellen mit Calyculin A inhibiert (Abb. 13B). Eine wie in der Literatur unter hohen Konzentrationen von Calyculin A beobachtete Hemmung der DNA-Bindung von STAT6 ist somit nicht für die Inhibition der Transkription bei den verwendeten Inhibitorkonzentrationen verantwortlich.

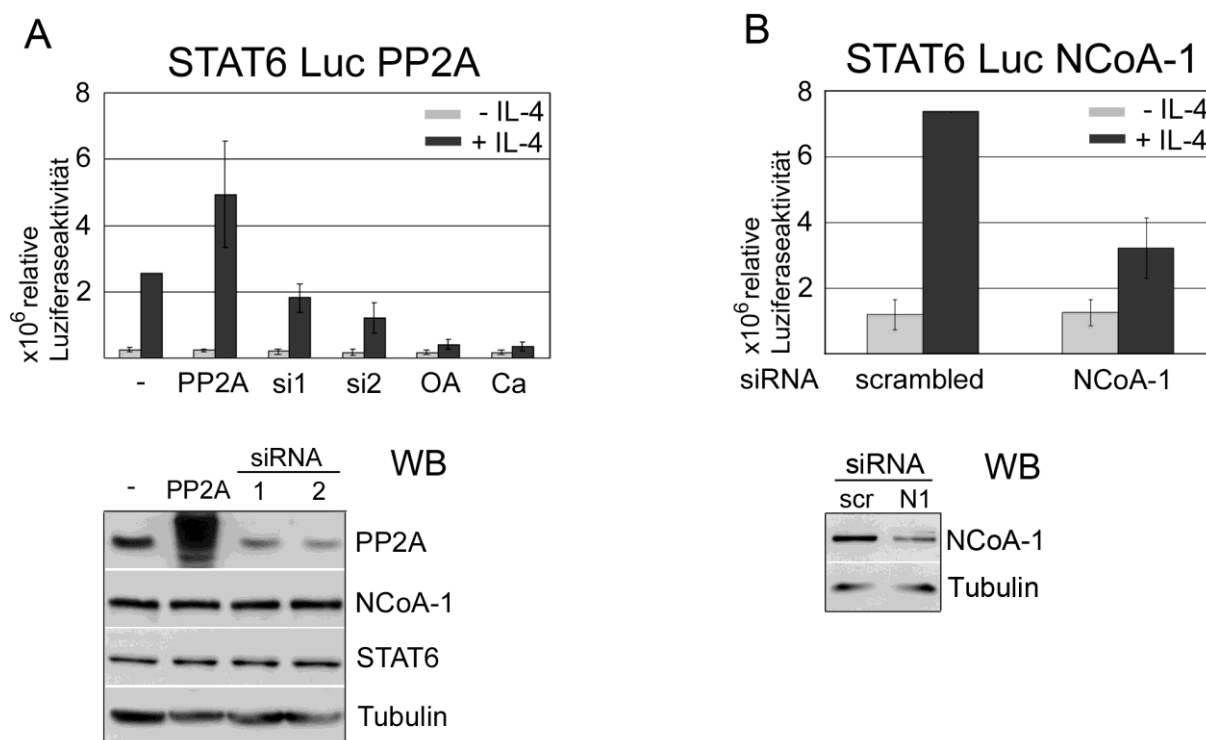
Die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase liegt nach Okadasäure oder Calyculin A Behandlung verstärkt phosphoryliert vor (Abb. 13C). Hierdurch kann die leicht erhöhte Transkription durch STAT6 in den unstimulierten, Inhibitor behandelten Zellen erklärt werden (Abb. 13A), die allerdings bei den unstimulierten Proben beim Östrogenrezeptor nicht beobachtet wird. Die Östrogenrezeptor vermittelte Transkription wird durch niedrige Konzentrationen von Okadasäure und Calyculin A verstärkt. Dies konnte bereits für Okadasäure gezeigt werden, ist aber nicht auf eine veränderte NCoA-1 Rekrutierung

zurückzuführen (Lu, Surks et al. 2003). Diese konnte auch nicht im Pulldownexperiment aus Ramos Zellen (Abb. 11C) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Experimenten zeigen klar, daß die STAT6 vermittelte Transkription von Serin-/Threoninphosphataseaktivität, vermutlich von PP2A abhängt. Es konnte auch gezeigt werden, daß eine Hemmung der Transkription durch Phosphataseinhibitoren in den verwendeten Konzentrationen weder die Aktivierung noch die DNA-Bindung von STAT6 beeinflusst.

### **7.11 Die STAT6-vermittelte Transkription ist abhängig von der zellulären PP2A-Phosphataseaktivität**

Um spezifisch den Einfluß von PP2A auf die STAT6 abhängige Transkription zu untersuchen, wurde der Einfluß des zellulären PP2A Expressionslevels auf die STAT6 vermittelte Transkription untersucht. PP2A wurde in Zellen überexprimiert oder die Expression von PP2A durch spezifischen Knockdown verringert. Zum Vergleich wurden Proben mit Okadasäure oder Calyculin A behandelt. Die Expression von PP2A, NCoA-1 und STAT6 wurde im Westernblot nachgewiesen.

Die STAT6 vermittelte Transkription wird durch PP2A reguliert. Die IL-4 induzierte Expression des Reportergens wird durch die transiente Überexpression von PP2A verstärkt, während die verminderte Expression von PP2A C zu einer verringerten Transkription führt (Abb. 14A). Im direkten Vergleich zur Behandlung der Zellen mit den Phosphataseinhibitoren Okadasäure und Calyculin A ist die Hemmung durch spezifischen Knockdown nicht so effektiv (Abb. 14A). Dies könnte daher rühren, daß die essentielle, stark exprimierte Phosphatase nicht vollständig durch die Behandlung mit spezifischen siRNAs ausgeschaltet wird. Im Westernblot konnte gezeigt werden, daß die Stabilität von NCoA-1 und STAT6 durch die veränderte Expression von PP2A nicht verändert wird.



**Abb. 14: PP2A regulierte Transkription von STAT6.** A) PP2A abhängige Transkription durch den Transkriptionsfaktor STAT6. HEK 293T Zellen wurden mit 10 nM an spezifischen siRNAs gegen PP2A oder mit unspezifischen siRNAs transfiziert. 24 h später wurden sie mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen mit 50 ng HA-PP2A, bzw. Leervektor transfiziert. Die mit PP2A spezifischen siRNAs transfizierten Zellen wurden ebenfalls mit Leervektor transfiziert. Alle Zellen wurden mit je 100 ng Reporterplasmid E4 TK-Luc, 50 ng STAT6, 5 ng SV40  $\beta$ Gal und 10 ng GFP kodierendem Vektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit IL-4 (10 ng / ml) stimuliert, bzw. parallel mit je 10 nM Okadasäure oder Calyculin A behandelt. Die Expression von PP2A wurde im Westernblot untersucht. B) NCoA-1 abhängige, STAT6 getriebene Transkription. HEK 293T Zellen wurden mit 10 nM unspezifischer oder spezifischer siRNA transfiziert. 24 h später erfolgte die Transfektion der Komponenten des Reportergenversuchs und anschließend die Stimulation wie in A). Die Expression von NCoA-1 wurde im Westernblot untersucht. Die gezeigten Ergebnisse der Reportergenexperimente sind die Ergebnisse dreier biologisch unabhängiger Experimente, jeweils normiert über den induzierten Wert ohne Inhibitorbehandlung oder die Expression verändernden Transfektion.

Um die Bedeutung von NCoA-1 und PP2A in der STAT6 abhängigen Transkription vergleichen zu können, wurde die Abhängigkeit der STAT6 vermittelten Transkription von NCoA-1 untersucht. Entsprechend zu den Reportergenexperimenten mit unterschiedlicher PP2A Expression wurde die Expression von NCoA-1 durch eine spezifische siRNA verringert und die STAT6 getriebene Transkriptionsaktivierung im Reportergenexperiment gemessen. Die STAT6 vermittelte Transkription ist von NCoA-1 abhängig. Durch den speziellen Knockdown von NCoA-1 durch siRNAs konnte eine Abhängigkeit der STAT6 vermittelten Transkription von NCoA-1 bestätigt werden (Abb. 14B) (Litterst and Pfitzner 2001). Der selektive Knockdown von zellulärem PP2A und NCoA-1 führen zur ähnlichen Effekten auf die STAT6 getriebene Transkription.

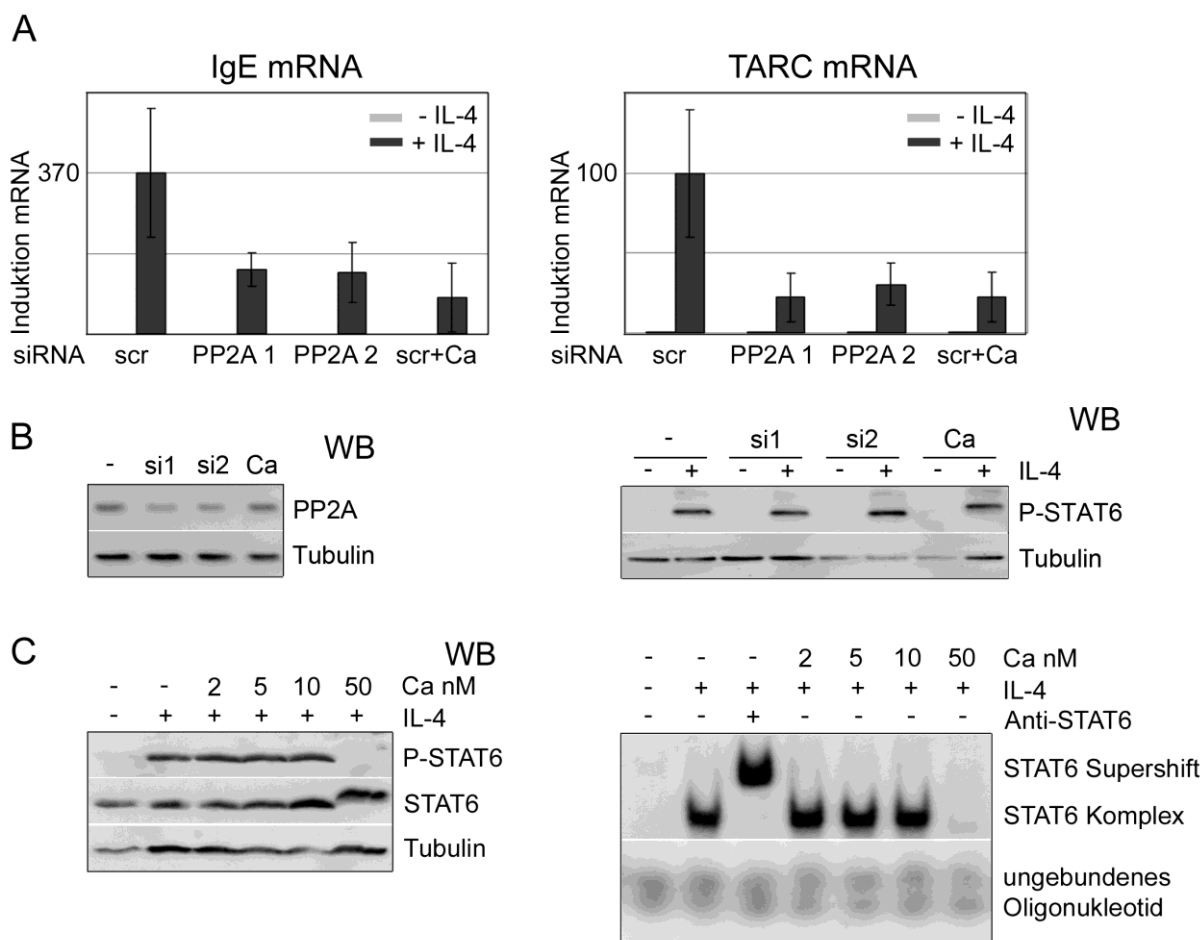
## 7.12 Die Phosphataseaktivität von PP2A reguliert die Expression von endogenen Zielgenen in humanen B Zellen

Um zu klären, ob PP2A auch die Expression von endogenen Zielgenen von STAT6 reguliert, wurde die Expression von Ig-Epsilon, einem wichtigen Gen in der B-Zell Differenzierung und von TARC (Thymus- and activation-regulated cytokine), einem durch B-Zellen

ausgeschütteten Chemokin in Abhängigkeit von PP2A in humanen IL-4 stimulierbaren Ramos B Zellen untersucht. Hierfür wurden Ramos B Zellen mit spezifischen siRNAs gegen PP2A, bzw. mit unspezifischen siRNAs transfiziert. Zum Vergleich wurden Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert waren, parallel zur Stimulation mit IL-4 mit Calyculin A behandelt. Die Expression von IgE und TARC wurden mittels quantitativer RT-PCR, die Aktivierung von STAT6 und der Knockdown von PP2A C im Westernblot untersucht.

Die Expression der endogenen Zielgene von STAT6 Ig-Epsilon und TARC wird durch PP2A reguliert (Abb. 15A). Die Expression von endogenem PP2A wird in Ramos B Zellen durch spezifische siRNAs verringert (Abb. 15B) und führt zur Inhibition der IL-4 induzierten Expression der STAT6 Zielgene. Die Expression von Ig-Epsilon und TARC durch IL-4 Stimulation wird ca. 370 fach, bzw. 100 fach induziert. Übereinstimmend mit den Reporter-genexperimenten (Abb. 14A) wurde auch bei der Expression der endogenen STAT6 Zielgene eine Abhängigkeit von PP2A beobachtet (Abb. 15A). Die Behandlung der Zellen mit Calyculin A inhibiert die Expression effektiver als die Verringerung der Expression durch spezifische siRNAs (Abb. 15A). Somit ist die Hemmung durch Calyculin A effektiver als der in den Ramos B Zellen erreichte anteilige Knockdown von PP2A. Die stärkere Inhibition der Expression der Zielgene durch Calyculin A könnte aber auch auf die Inhibition anderer Phosphatasen zurückzuführen sein. Durch die Verwendung spezifischer siRNAs konnte selektiv die Regulation der Transkription über STAT6 in Abhängigkeit von PP2A gezeigt werden.

Nach spezifischem Knockdown von PP2A und nach Inhibitorbehandlung wurde die STAT6 Tyrosinphosphorylierung im Westernblot und die DNA-Bindung in Gelretardationsexperimenten analysiert. Wie auch in den HEK 293T Zellen wurde in den Ramos Zellen weder die Tyrosinphosphorylierung, noch die DNA-Bindung von STAT6 in Gelretardationsexperimenten durch die Inhibitorbehandlung beeinflusst.



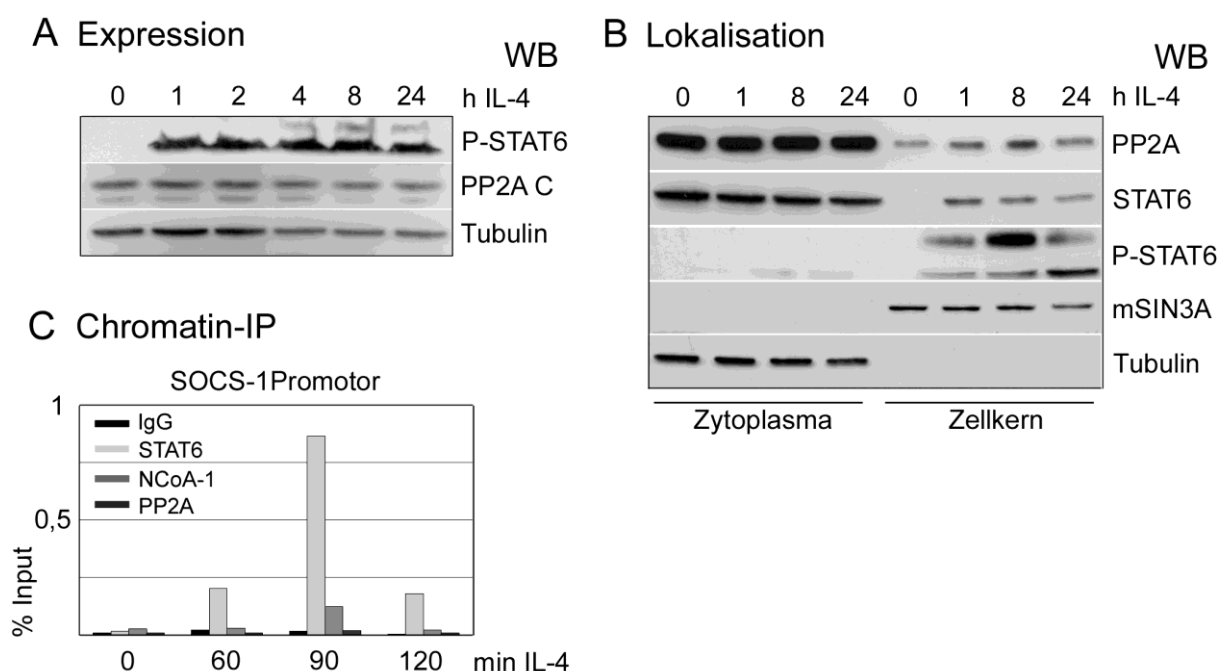
**Abb. 15: PP2A-regulierte Expression von endogenen Zielgenen in humanen B Zellen.** A) Expression endogener Zielgene in Ramos B Zellen nach IL-4 Stimulus. Je  $2,5 \times 10^6$  Ramos B-Zellen wurden mit 40 nM spezifischen siRNAs gegen PP2A, bzw. unspezifischer siRNA (scr) mit dem Amaxa System transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium gegen Medium mit 1% FKS gewechselt und dieses erneut nach weiteren acht Stunden gegen frisches Medium mit 1% FKS gewechselt. Die Stimulation mit IL-4 (10 ng/ ml) erfolgte für 24 h. Eine Probe, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurde, wurde parallel zur IL-4 Stimulation mit Calyculin A (2 nM) behandelt. Die Zellen wurden geerntet und für die Untersuchung der RNA Expression, sowie die Untersuchung der Aktivierbarkeit von STAT6 und den Knockdown von PP2A im Westernblot aufgeteilt. Die Untersuchung der Expression erfolgte nach reverser Transkription in quantitativer PCR. Die Ergebnisse sind der Mittelwert dreier biologisch unabhängiger Experimente, normiert über den induzierten Wert der Zellen mit Transfektion mit unspezifischer siRNA. B) Nachweis des Knockdown von PP2A und der STAT6 Aktivierung durch IL-4 nach PP2A Knockdown bzw. Calyculin A Behandlung im Westernblot C) Untersuchung der STAT6 Aktivierbarkeit und DNA-Bindung durch IL-4 unter Calyculin A Behandlung. Ramos B Zellen wurden für 2 h mit IL-4 (10 ng/  $\mu$ l) stimuliert, parallel mit ansteigenden Konzentrationen an Calyculin A behandelt und anschließend WCE-Lysate von den Zellen hergestellt. WCE-Lysat wurde im Westernblot zum Nachweis von aktiviertem STAT6 durch einen Phospho-STAT6 spezifischen Antikörper und im Gelretardationsexperiment zur Untersuchung der STAT6 DNA-Bindung eingesetzt. Die Anwesenheit von STAT6 im DNA-bindenden Komplex wurde mit einem STAT6 spezifischen Antikörper durch Supershift bestätigt.

### 7.13 Untersuchung der Regulation von PP2A durch IL-4

PP2A ist eine hoch exprimierte Phosphatase, deren Aktivität durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Unterschiedliche Regulationsmechanismen von PP2A in der IL-4 vermittelten Signaltransduktion sind bereits beschrieben. Eine Induktion der Expression von PP2A C auf Proteinebene durch IL-4 Stimulation konnte bereits gezeigt werden (Iribarren, Chen et al. 2005). Die Aktivität von PP2A kann durch durch JAK2 vermittelte Phosphorylierung reguliert werden (Yokoyama, Reich et al. 2001). Klassischerweise erfolgt die Signaltransduktion von IL-4 zellulär über JAK1 und JAK3. In B-Zellen gibt es aber

mehrere unabhängige Untersuchungen, die eine JAK2-vermittelte Aktivierung von STAT6 zeigen konnten (Mottok, Renne et al. 2007). Die subzelluläre Verteilung von PP2A und somit die Verfügbarkeit von Phosphataseaktivität könnte eine weitere Möglichkeit der Regulation darstellen. So wurde eine Umverteilung von PP2A nach Interferon Alpha Stimulation in myeloiden Leukämiezellen von der Membranfraktion zur zytoplasmatischen Fraktion beschrieben. (Saydam, Aydin et al. 2003). Ein sehr geringer Anteil zellulären PP2A ist im Zellkern lokalisiert (Ruediger, Van Wart Hood et al. 1991). Eine induzierte Translokation von PP2A in den Zellkern als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli könnte somit eine effektive Möglichkeit der Regulation differentieller Genexpression darstellen.

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-4 vermittelter Signaltransduktion auf die zelluläre PP2A Expression wurden Ramos B Zellen in einer Zeitreihe mit IL-4 stimuliert. Anschließend wurden die Expression von PP2A und die Aktivierung von STAT6 nachgewiesen. Die Expression der katalytischen Untereinheit von PP2A wird in humanen Ramos B Zellen nicht durch IL-4 reguliert (Abb. 16A).



**Abb. 16: Regulation von PP2A durch IL-4 Signaltransduktion.** A) IL-4 abhängige Expression der katalytischen Domäne von PP2A. Ramos B Zellen wurden in einer Zeitreihe mit IL-4 (10 ng/ ml) stimuliert. Die STAT6 Aktivierung und die PP2A Expression wurden in Gesamtzellextrakten nachgewiesen. B) Lokalisation der katalytischen Untereinheit von PP2A nach IL-4 Stimulus. Ramos B Zellen wurden in Zeitreihe mit IL-4 (10 ng/ ml) stimuliert und anschließend eine Zytoplasma/ Nukleus Fraktionierung durchgeführt. PP2A, STAT6, Phospho-STAT6, mSIN3A als Kernprotein, sowie Tubulin als Zytoplasmaprotein wurden im Westernblot in den Fraktionen nachgewiesen. C) DNA-Bindung von STAT6, NCoA-1 und PP2A auf dem SOCS-1 Promotor. Für Chromatinimmunpräzipitationsexperimente wurden pro IP Reaktion  $3 \times 10^6$  Zellen verwendet. Ramos B Zellen wurden in frischem Medium in einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen / ml aufgenommen. Nach 24 h wurden die Zellen mit IL-4 (10 ng/ ml) in einer Zeitreihe stimuliert und nach Proteinquervernetzung die zytoplasmatische Fraktion durch Zytoplasma/ Nukleus Fraktionierung entfernt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit je 2 µg spezifischem Antikörper. Als Negativkontrolle wurden IPs mit unspezifischem IgG durchgeführt. Immunpräzipitierte SOCS-1 Promotorregionen wurden mit spezifischen Primern mittels quantitativer PCR nachgewiesen.

Um zu klären, ob die subzelluläre Lokalisation von PP2A durch IL-4 Stimulation reguliert wird, wurde die Verteilung von PP2A nach IL-4 Stimulation in Ramos B Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit IL-4 in Zeitreihe stimuliert, anschließend eine Zytoplasma/ Nukleus

Fraktionierung durchgeführt und die Proteine in den Fraktionen nachgewiesen. Zur Kontrolle der Effizienz der zellulären Fraktionierung und als Ladungskontrolle wurden Tubulin als zytoplasmatisches und mSIN3A als Kernprotein nachgewiesen.

Die Stimulation der Zellen führt zur Aktivierung und Translokation von STAT6 in den Zellkern (Abb. 16B). Neben der Aktivierung von STAT6 wird die subzelluläre Verteilung von PP2A, das wie in der Literatur beschrieben überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert ist, zur Kernfraktion verschoben (Abb. 16B). Dieser Effekt ist transient und läuft parallel zur STAT6 Aktivierung. Da der Anteil des kernlokalisierten PP2A am gesamt zellulären PP2A sehr gering ist, könnte die Verschiebung von Phosphataseaktivität hin zum Ort der Transkription eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung spielen.

Da PP2A über den basalen Transkriptionsapparat an transkriptionell aktive Regionen rekrutiert wird (Xing, Vanderford et al. 2008) sollte untersucht werden, ob PP2A im Zellkern am Promotor eines STAT6 Zielgenes rekrutiert wird und so potentiell die Koaktivatorrekrutierung reguliert. Hierfür wurden Chromatinimmunpräzipitationsexperimente (ChIP) durchgeführt. Ramos B Zellen wurden mit IL-4 stimuliert und STAT6, NCoA-1 sowie PP2A aus den Kernfraktionen präzipitiert. Die immunpräzipitierte Promotorregion des SOCS-1 Gens wurde mit quantitativer PCR nachgewiesen. SOCS-1 ist ein schnell induziertes STAT6 Zielgen mit drei STAT6 Bindestellen im Promotor und die Bindung von STAT6 am SOCS-1 Promotor nachweisbar.

Die Untersuchung der STAT6, bzw. NCoA-1 und PP2A DNA-Bindung durch ChIP Experimente zeigt, daß STAT6 nach IL-4 Stimulation im SOCS-1 Promotor bindet und nachfolgend NCoA-1 als Koaktivator rekrutiert wird (Abb. 16C). Für PP2A konnte keine Bindung auf dem SOCS-1 Promotor nachgewiesen werden. PP2A ist an der Transkriptionsaktivierung durch STAT6 beteiligt, scheint aber die Koaktivatorrekrutierung nicht am Promotor zu regulieren oder bindet zu schwach oder zu kurz an die Promotorregion. Da für die DNA-Bindung von PP2A keine Positivkontrolle zur Verfügung stand, kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß der verwendete Antikörper nicht für ChIP Experimente geeignet ist.

#### **7.14 Untersuchung der Zusammensetzung des Koaktivorkomplexes:**

Neben NCoA-1 sind CBP und P100 als Transkriptionskoaktivatoren von STAT6 bekannt (Gingras, Simard et al. 1999) (Valineva, Yang et al. 2005). Durch KoIP Experimente sollte der Einfluß von Calyculin A auf die Interaktion von STAT6 mit den Koaktivatoren CBP und P100, sowie auf die Interaktion von CBP mit NCoA-1 untersucht werden. NCoA-1 und CBP interagieren beide mit STAT6 und NCoA-1 und CBP interagieren miteinander. Aus diesem Zusammenhang könnte die Rekrutierung eines Koaktivators die Rekrutierung des anderen beeinflussen. P100 wirkt als Koaktivator als Stabilisator der Interaktion von CBP an STAT6

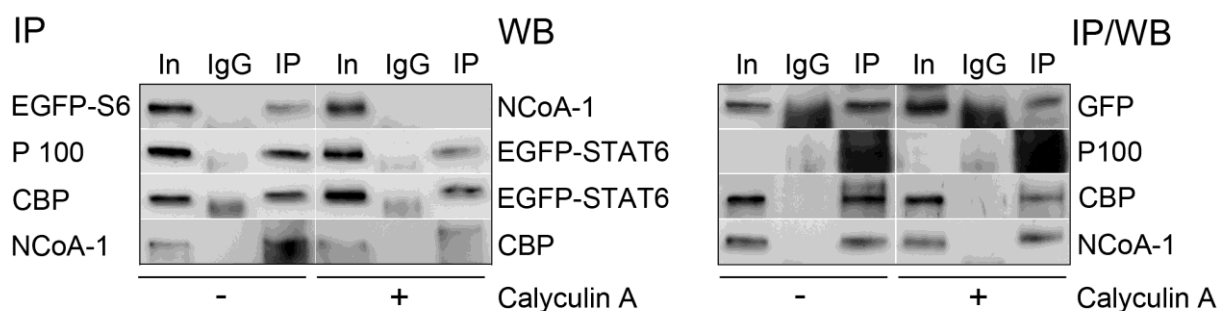


(Valineva, Yang et al. 2005). Von daher könnte auch P100 indirekt die Bindung von NCoA-1 an STAT6 stabilisieren, indem es ein möglicherweise korekrutiertes CBP an STAT6 hält.

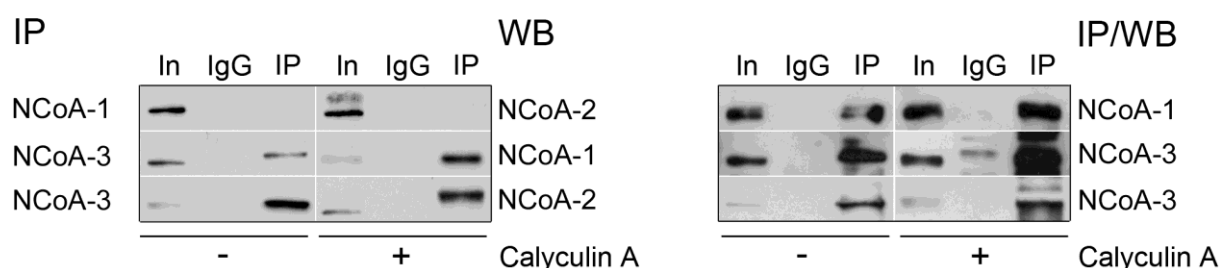
Zur Untersuchung der Regulation des Koaktivator Komplexes von STAT6 durch Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung wurde überexprimiertes EGFP-fusioniertes STAT6 aus Gesamtzellextrakten präzipitiert. Anschließend wurde NCoA-1 in den Immunpräzipitaten nachgewiesen. Die Untersuchung der Bindung der Koaktivatoren P100 und CBP erfolgte durch Präzipitation der endogenen Proteine und Nachweis von EGFP-STAT6 in den Immunpräzipitaten. Die Interaktionsstudie von NCoA-1 mit CBP wurde mit den endogenen Proteinen im Vergleich mit und ohne Calyculin A Behandlung durch NCoA-1 Präzipitation durchgeführt.

Calyculin A inhibiert die Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6, die Interaktion der anderen STAT6 Koaktivatoren oder die Interaktion der Koaktivatoren untereinander nicht signifikant.

## A STAT6 Koaktivatoren



## B NCoA-Komplex



**Abb. 17: Einfluß von Calyculin A auf die STAT6 / Koaktivatorassemblierung.** A) Untersuchung des Einflusses der Calyculin A Behandlung auf die Koaktivatorrekrutierung durch STAT6. HEK 293T Zellen in 10 cm Schalen wurden mit 250 ng EGFP-STAT6 transfiziert. 24 h später wurde STAT6 über den EGFP-Tag, oder endogenes P100 und CBP mit je 2 µg spezifischem Antikörper aus den Gesamtzelllysaten der mit oder ohne Calyculin A vorbehandelten (10 nM, 2 h) Zellen präzipitiert. Die Untersuchung der Interaktion zwischen NCoA-1 und CBP wurde durch Präzipitation von NCoA-1 aus untransfizierten Zellen durchgeführt. Jeweils präzipitiertes und kopräzipitiertes Protein wurden nach SDS-PAGE im Westernblot nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde je eine IP mit unspezifischem IgG durchgeführt. Inputs für die Versuche: STAT6/ NCoA-1: 2%, P100/ STAT6: 1%, CBP/ STAT6: 3%, NCoA-1/ CBP: 2%. B) Phosphorylierungsabhängige Interaktion der NCoA Koaktivatoren untereinander. NCoA-1 und NCoA-3 wurden aus NETN-Extrakten unbehandelter oder mit Calyculin A vorbehandelter (10 nM, 2 h) BJAB Zellen präzipitiert. Jeweils präzipitiertes und kopräzipitiertes NCoA wurde im Westernblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurde je eine IP mit unspezifischem IgG durchgeführt. Als Input wurden je 2% aufgetragen.

Durch die Interaktionsstudien konnte die durch Calyculin A inhibierte Interaktion von STAT6 und NCoA-1 reproduziert werden (vergl. Abb. 5). Identisch durchgeführte KoIP Experimente

zeigten aber, daß die Interaktion von STAT6 mit den Koaktivatoren P100 und CBP nicht so deutlich reguliert wird (Abb. 17A). Da hyperphosphoryliertes NCoA-1 nicht an STAT6 bindet, steht es für eine mögliche Korekrutierung von CBP an STAT6 nicht zur Verfügung. Die Rekrutierung von NCoA-1 oder CBP an STAT6 scheint somit nicht von der Korekrutierung des jeweils anderen Koaktivators abhängig zu sein.

Phosphataseinhibitoren induzieren eine Hyperphosphorylierung von CBP überwiegend in dem Bereich, der für die CBP vermittelte Transkriptionsaktivierung wichtig ist (Gingras, Simard et al. 1999; Yalcin, Koulich et al. 2003). Die vermutete Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von CBP hat somit keinen Einfluß auf die Bindung an STAT6 (Abb. 17A), obwohl der hyperphosphorylierte Teil von CBP für die Transkriptionsaktivierung von Bedeutung ist (Gingras, Simard et al. 1999). Die Bindung von P100 an STAT6 wird durch die Calyculin A Behandlung ebenso nicht reguliert.

Die AD1 von NCoA-1, die die Bindung an CBP vermittelt, wird durch Calyculin A Behandlung hyperphosphoryliert (Abb. 10B). Der Einfluß der Calyculin A Behandlung auf die Interaktion von NCoA-1 mit CBP ist allerdings sehr gering.

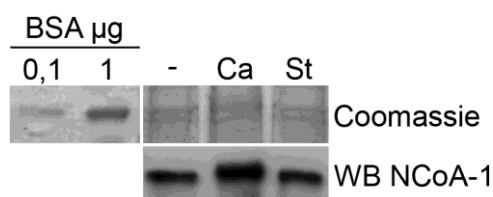
NCoA Proteine interagieren durch Bindung ihrer PAS B Domäne mit der CBP Interaktionsdomäne miteinander (Lodrini, Munz et al. 2008) und beide Domänen werden durch Calyculin A Behandlung in NCoA-1 hyperphosphoryliert (Abb. 10B). Daher sollte untersucht werden, ob die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung die Interaktion zwischen den Mitgliedern der NCoA Familie beeinflusst. Endogenes NCoA-1 und NCoA-3 wurden präzipitiert und die Kopräzipitation eines jeweils anderen Familienmitglieds nachgewiesen.

Die Interaktion der NCoA Koaktivatoren ist nicht durch die Inhibition zellulärer Serin-/Threoninphosphatasen reguliert (Abb. 17B). Da die Affinität der über die PAS Domäne miteinander interagierenden NCoAs zueinander nicht verändert ist, ist die verringerte Affinität von NCoA-1 an STAT6 nicht durch eine stärkere Bindung von NCoA-1 im Koaktivator-komplex zu erklären. Aus den durchgeführten Interaktionsstudien konnte geschlossen werden, daß die Bindung von NCoA-1 an STAT6 nicht durch die Veränderung der Bindungsstärke der untersuchten Koaktivatoren bedingt ist. Die Calyculin A induzierte Verringerung der Bindungsstärke von NCoA-1 an STAT6 ist somit nicht durch die Zusammensetzung des Koaktivatorkomplexes in Hinblick auf die untersuchten Proteine zu erklären.

### **7.15 Identifikation der Calyculin A induziert phosphorylierten Aminosäuren**

Da Calyculin A die Hyperphosphorylierung von NCoA-1 induziert und dies die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 reguliert, sollten Aminosäuren identifiziert werden, die nach der Calyculin A Behandlung phosphoryliert vorliegen. Die Phosphorylierung von NCoA-1 wurde massenspektrometrisch untersucht. Zur Analyse wurde überexprimiertes NCoA-1 aus Extrakten von Zellen präzipitiert, die zuvor mit Calyculin A (Induktion der

Hyperphosphorylierung) oder mit Staurosporin (Hemmung jeglicher Phosphorylierung) behandelt wurden. Nach dem Gellauf (Abb. 18) wurden charakteristische Banden der Größe von 160 kDa in die Analyse eingesetzt.



**Abb. 18: NCoA-1 Präzipitation für die Untersuchung in der Massenspektrometrie.** HEK 293T Zellen in 15 cm Schalen wurden mit 10 µg NCoA-1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen für 2 h mit Calyculin A (10 nM) oder Staurosporin (200 nM) behandelt. Aus den NETN-Extrakten der Zellen wurde NCoA-1 mit je 20 µg NCoA-1 spezifischem Antikörper präzipitiert und anschließend 99% in die SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung eingesetzt. Deutliche Banden der Größe von ca. 160 kDa, die im parallelen Westernblot aus 1% der Präzipitation mit einem NCoA-1 spezifischen Antikörper nachgewiesen wurden, wurden aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten massenspektrometrisch auf Phosphorylierung untersucht.

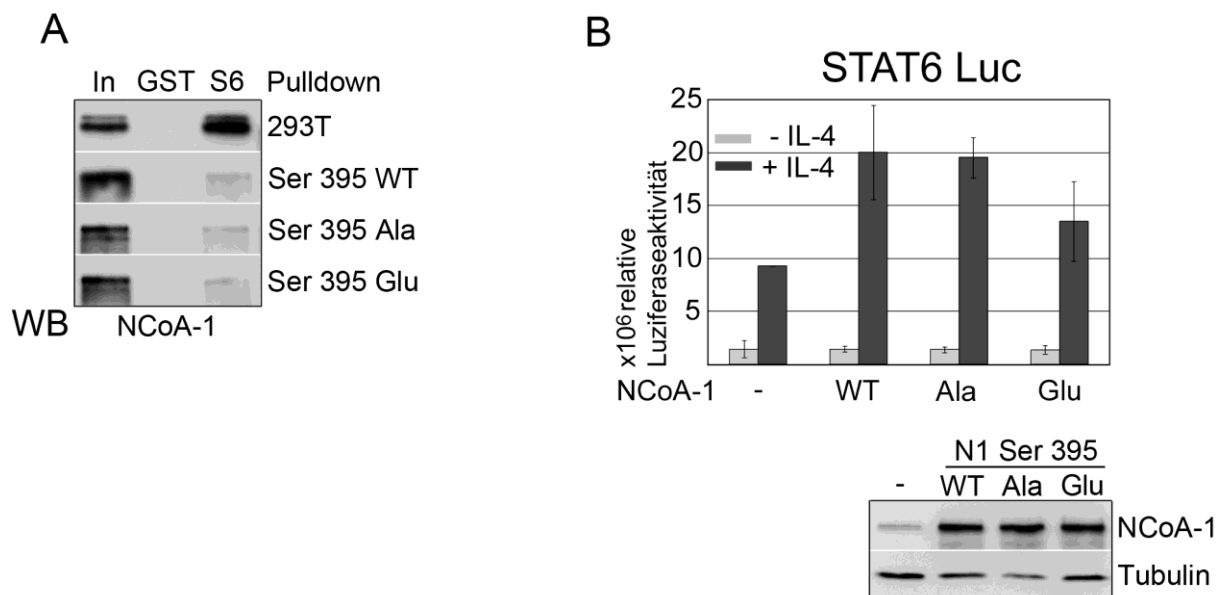
In der massenspektrometrischen Untersuchung wurden nach tryptischem Verdau Peptide von NCoA-1 identifiziert, die gemeinsam ca. 25% der Aminosäuresequenz von NCoA-1 abdecken. Die Untersuchung der Phosphorylierungszustände von NCoA-1 nach Inhibitorbehandlung zeigt neben weiteren modifizierten Aminosäuren eine Phosphorylierung des Serins 395. In unabhängigen Versuchen konnte eine Calyculin A abhängige und eine Calyculin A unabhängige Phosphorylierung des Serins 395 beobachtet werden. Für die Region 370-462 konnte durch die radioaktive Markierung eine Calyculin A induzierte Phosphorylierung gezeigt werden (Abb. 10B). Das Serin 395 ist laut Analyse *in silico* (<http://networkin.info/search.php>) ein potentiell Substrat für mehrere Kinasen, unter anderem auch für Cdk2. Cdk2 wurde bereits als NCoA-1 phosphorylierende Kinase beschrieben (Narayanan, Adigun et al. 2005). Durch diese Beobachtungen und durch die Nähe des Serins 395 zum mit STAT6 interagierenden Kernbereich stand somit das Serin 395 bei der weiteren Untersuchung im Vordergrund.

### 7.16 Funktionelle Untersuchung der Modifikation von NCoA-1 Ser 395 in Proteininteraktionsstudien und Reportergenversuchen

Da die Aminosäure Serin 395 eine potentiell nach Calyculin A Behandlung phosphorylierte Aminosäure ist, sollte der Einfluß der Phosphorylierung von Serin 395 auf die Interaktion mit STAT6 und in der STAT6 vermittelten Transkription untersucht werden.

Die Aminosäure Serin 395 liegt nicht unmittelbar in der für die Interaktion mit STAT6 benötigten Minimalregion von NCoA-1. Dennoch könnte eine Phosphorylierung in unmittelbarer Nähe zum interagierenden Bereich einen Einfluß auf die Interaktion, z. B. durch Konformationsänderung haben. Durch Punktmutation S395A des Serin 395 zu Alanin (nicht phosphorylierbar), bzw. S395E zu Glutaminsäure (Phospho-Mimik) sollte der Einfluß

des Phosphorylierungszustands von Serin 395 auf die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 untersucht werden. Die Aminosäuremutanten von NCoA-1 S395A und S395E, sowie der Wildtyp wurden *in-vitro* transkribiert und translatiert und in GST-Pulldown Experimenten deren Bindung an der GST-STAT6 TAD eingesetzt. Zum Vergleich wurde NCoA-1 aus Gesamtzellextrakten im GST-Pulldown analysiert.



**Abb. 19: Einfluß der Modifikation von Serin 395 von NCoA-1 auf die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 und die Transkriptionsaktivierung über STAT6.** A) Endogenes NCoA-1 aus HEK 293T Zellen und *in-vitro* translatiertes NCoA-1 WT und S395A sowie S395E in Pulldown Experiment an GST-STAT6-Transaktivierungsdomäne. Je 10 µl Retikulozytenlysat mit *in-vitro* translatiertem WT NCoA-1, sowie die S395A und die S395E Mutanten und endogenes NCoA-1 aus 200 µg NETN Extrakten aus HEK 293T Zellen wurden in den GST Pulldown an je 5 µg gekoppeltem GST, bzw. GST-STAT6-Transaktivierungsdomäne eingesetzt. Gebundenes NCoA-1 wurde nach SDS-PAGE im Westernblot mit NCoA-1 spezifischem Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde jeweils 10% aufgetragen C) NCoA-1 modifikationsabhängige STAT6 vermittelte Transkription im Reporterexperiment. HEK 293T Zellen in 24 Loch Platten wurden mit je 100 ng Reporterplasmid, 50 ng STAT6, 5 ng SV40 β-Gal, 50 ng NCoA-1, der S395A der S395E Mutante, bzw. Leervektor und 10 ng GFP kodierendem Vektor transfiziert. 24 h danach wurden die Zellen mit IL-4 (10 ng/ ml) für 8 h stimuliert. Anschließend wurden die Luciferaseaktivitäten in den Lysaten der Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind der Mittelwert dreier biologisch unabhängiger Experimente normiert über den induzierten Wert der Probe ohne NCoA-1 Transfektion. Für die Kontrolle der Expression von NCoA-1 und den Mutanten wurden HEK 293T Zellen in 6 Loch Maßstab mit je 300 µg der NCoA-1 Konstrukte transfiziert. NCoA-1 wurde mit spezifischen Antikörper im Westernblot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Tubulin nachgewiesen.

Der durch Mutagenese simulierte Phosphorylierungszustand von Serin 395 hat keinen Einfluß auf die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6. Die *in vitro* translatierten Mutanten von NCoA-1 binden identisch schwach an die GST-STAT6 TAD (Abb. 19A). Die Veränderung der Bindung von NCoA-1 zu STAT6 ist somit nicht oder nicht ausschließlich durch den Phosphorylierungszustand des Serins 395 reguliert. Im Vergleich zum in identischer Menge an NCoA-1 aus Zellen eingesetzten NCoA-1 binden die *in vitro* translatierten Proteine deutlich schwächer an STAT6. Ein Unterschied der Bindung der *in vitro* translatierten Proteine ist nicht erkenntlich.

Parallel wurde der Einfluß der Mutanten auf die STAT6 vermittelte Transkription untersucht. Die S395A und die S395E Mutanten, sowie der Wildtyp von NCoA-1 wurden im Reporterexperiment untersucht. Zellen wurden mit den Komponenten des

Reporter-gen-experiments, mit den NCoA-1 Serin 395 Phosphorylierungsmutanten bzw. dem Wildtyp transfiziert und der Einfluß auf die Transkription untersucht. Die Überexpression von NCoA-1 in Zellen führt zu erhöhter STAT6 vermittelter Transkription (Abb. 19B). Die Mutation des Serin 395 zu Alanin (nicht phosphorylierbar) zeigt den gleichen Effekt, während zutransfiziertes NCoA-1 mit zu Glutaminsäure mutiertem Serin 395 (Phospho-Mimik) die STAT6 vermittelte Transkription etwas schwächer aktiviert. Obwohl die Mutation des Serin 395 nicht zu veränderter Rekrutierung an STAT6 führt, spielt das Serin 395 potentiell eine Rolle bei der STAT6 vermittelten Transkription.

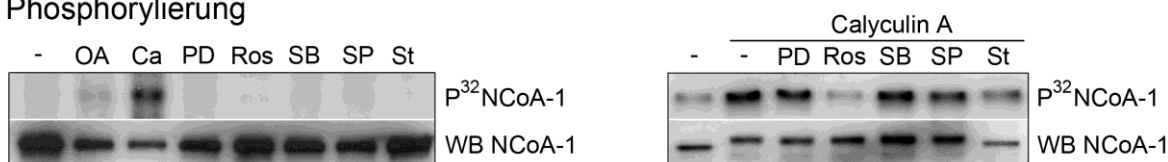
### **7.17 Identifikation der NCoA-1 phosphorylierenden Kinase, die zu verminderter Interaktion von NCoA-1 und STAT6 führt**

Nach der Charakterisierung von PP2A als Regulator der STAT6/ NCoA-1 Interaktion sollte die Kinase identifiziert werden, die die Phosphorylierung von NCoA-1 vermittelt und somit die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 inhibiert. Da bereits verschiedene Kinasesignalwege für die Regulation der STAT6 vermittelten Transkription bekannt sind, wurden die in den KoIP Experimenten (Abb. 5) verwendeten Inhibitoren verwendet. Da anders als ursprünglich angenommen die Phosphorylierung von NCoA-1 und nicht die von STAT6 ausschlaggebend für die Interaktion von STAT6 mit NCoA-1 ist, wurde zusätzlich Roscovitin eingesetzt. Roscovitin hemmt die Zyklin abhängige Kinase 2 (Cdk2), die NCoA-1 phosphoryliert (Narayanan, Adigun et al. 2005). Calyculin A induziert die Hyperphosphorylierung von NCoA-1 und die Phosphorylierung von NCoA-1 ist basal im Vergleich sehr gering. Die Inhibitoren wurden alleine und in Kombination mit Calyculin A eingesetzt. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Inhibitoren das basale Phosphorylierungslevel von NCoA-1 verringern können, bzw. die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung revertieren können.

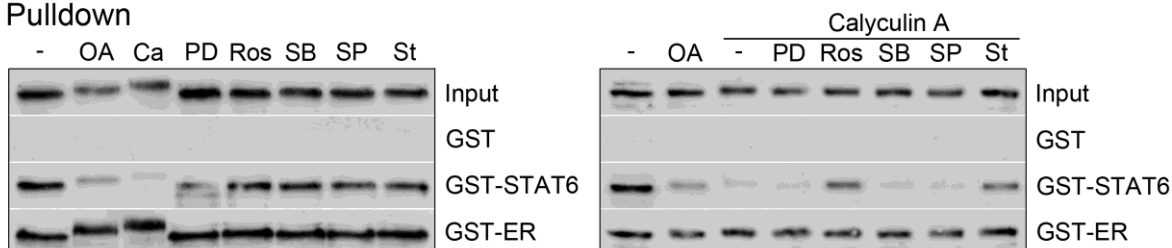
Überexprimiertes metabolisch radioaktiv markiertes NCoA-1 wurde aus Gesamtzellextrakten nach Inhibitorbehandlung immunpräzipitiert. Die Präzipitation wurde im Westernblot, die Phosphorylierung in der Autoradiographie untersucht.

Die Phosphorylierung von NCoA-1 wird weder von den an der STAT6 getriebenen Transkription beteiligten Kinasen (MEK Kinase, p38 MAPK, JNK Kinase), noch von Cdk2 oder Staurosporin beeinflusst (Abb. 20A). Das basale Phosphorylierungslevel von NCoA-1 ist niedrig und wird durch die Hemmung der Kinasen nicht weiter verringert (Abb. 20A links). Die Identifikation der NCoA-1 phosphorylierenden Kinase ist somit durch die Verwendung eines Kinaseinhibitors alleine nicht möglich. Wie bereits gezeigt (Abb. 7), induziert Calyculin A stark die Hyperphosphorylierung von NCoA-1 (Abb. 20A).

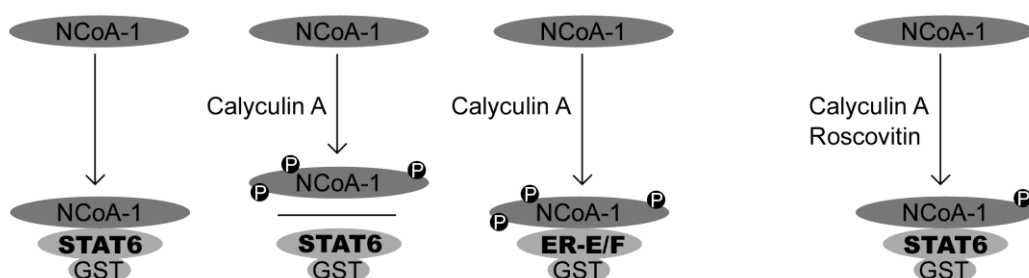
## A Phosphorylierung



## B Pulldown



## C Hyperphosphorylierung durch Calyculin A



**Abb. 20: Phosphorylierungslevel von NCoA-1 und Interaktion mit der STAT6 TAD nach Inhibition zellulärer Kinase-signalwege und Serin-/ Threoninphosphatasen.** A) Zur Untersuchung des Phosphorylierungslevels von NCoA-1 wurden HEK 293T Zellen auf 6 cm Schalen mit je 1,5 µg NCoA-1 transfiziert und nach 24 h Expression metabolisch mit  $P^{32}$  markiert. Anschließend wurden die Zellen 2 h mit Inhibitoren (Okadaic acid 10 nM, Calyculin A 10 nM, PD98059 50 µM, Roscovitin 3 µM, SB202190 10 µM, SP600125 200 nM, Staurosporin 200 nM) behandelt, oder 30 min mit Kinaseinhibitoren und anschließend 90 min in Kombination mit Calyculin A behandelt. NCoA-1 aus den NETN-Lysaten der Zellen mit je 3 µg spezifischem Antikörper präzipitiert. 95% des immunpräzipitierten Proteins wurde in die Autoradiographie eingesetzt, 5 % separat im Westernblot zur Kontrolle der Immunpräzipitation. B) Für die Untersuchung der Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 wurden untransfizierte HEK 293T Zellen mit Inhibitoren wie in A) behandelt und NCoA-1 aus je 300 µg NETN-Lysat aus den behandelten Zellen mit 5 µg vorgelegtem GST und GST-STAT6-Transaktivierungsdomäne ü. N. inkubiert. Gebundenes NCoA-1 wurde nach SDS-PAGE im Westernblot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurden je 10% des in die Interaktionsstudie eingesetzten Proteins eingesetzt. C) Hyperphosphorylierung und Revertierung von NCoA-1 durch Calyculin A und Roscovitin.

Diese ist durch die parallele Behandlung mit dem unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin revertierbar (Abb. 20A rechts). Durch die parallele Behandlung mit Roscovitin konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der Literatur, daß Cdk2 NCoA-1 phosphoryliert (Narayanan, Adigun et al. 2005), konnte eine Hemmung von Cdk2 die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung revertieren. Cdk2 ist somit möglicherweise die NCoA-1 phosphorylierende Kinase, deren Phosphorylierung unter physiologischen Bedingungen durch PP2A entfernt wird.

Zur Untersuchung des Einflusses zellulärer Kinasen auf die STAT6/ NCoA-1 Interaktion wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden mit Calyculin A und den Kinaseinhibitoren identisch für die Untersuchung der Phosphorylierung (Abb. 20A) von NCoA-1 mit den Inhibitoren behandelt. NCoA-1 aus Gesamtzellextrakten wurde in GST-Pulldowns an der über GST fusionierte STAT6 TAD eingesetzt. Die Revertierung der Calyculin A induzierten Hyperphosphorylierung von NCoA-1 (Abb. 20A) durch Staurosporin

und Roscovitin führt auch zu Revertierung der Bindung von NCoA-1 an STAT6 (Abb. 20B). Neben der Behandlung mit Staurosporin führt die Hemmung von Cdk2 zur Hemmung der Calyculin A induzierten Hyperphosphorylierung und stellt somit die Bindung von NCoA-1 an STAT6 wieder her. Demnach phosphoryliert Cdk2 NCoA-1 und inhibiert die Rekrutierung an STAT6, sofern PP2A inhibiert wird. Dieser Effekt konnte auch mit endogenen Proteinen aus Ramos B Zellen gezeigt werden (nicht gezeigt).

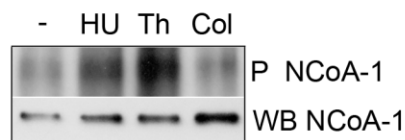
### **7.18 Untersuchung des Zellzyklusses auf die NCoA-1 Phosphorylierung und Interaktion mit STAT6**

Da die Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von NCoA-1 durch Roscovitin und somit Hemmung von Cdk2 revertiert wird, wurde die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von NCoA-1 durch Zellzyklusarrests untersucht. HEK 293T Zellen wurden mit NCoA-1 transfiziert und anschließend in der späten G1 Phase durch Hydroxyharnstoff, in der S-Phase durch Doppelthymidinblock und in der späten M-Phase durch Colcemid arretiert. Laut Literatur ist Cdk2 im Phasenübergang von der G1 zur S-Phase, in der S Phase und in der frühen G2 Phase aktiv. Eine Cdk2 abhängige Phosphorylierung von NCoA-1 sollte daher in unbehandelten Zellen, sowie in Zellen in der G1 und der S-Phase detektierbar sein. NCoA-1 wurde nach metabolischer Markierung aus Gesamtzellextrakten von Zellzyklus arretierten Zellen präzipitiert und seine Phosphorylierung in den Zellzyklusphasen untersucht.

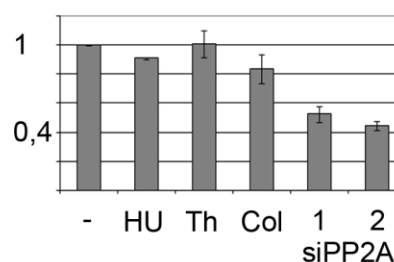
Die effektive Arretierung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen (Abb. 21D), führt zu unterschiedlichen Phosphorylierungsebenen von NCoA-1 (Abb. 21A). NCoA-1 ist in Zellen, die im G1/ S-Phasenübergang (Hydroxyurea Behandlung, Spur HU) und in Zellen die in der S-Phase arretiert sind (Doppelthymidinblock, Spur Th) höher als in den unbehandelten Zellen (Abb. 21A). Eine Arretierung der Zellen in der M-Phase, in der Cdk2 nicht aktiv ist, führt allerdings nicht zu verminderter Phosphorylierung.

Um zu untersuchen, ob die Zellzyklus abhängige Phosphorylierung von NCoA-1 durch eine im Zellzyklus reguliert veränderte PP2A Aktivität bedingt sein kann, wurde die PP2A Aktivität in Lysaten von Zellzyklus blockierten Zellen untersucht. Die Phosphataseaktivität von PP2A ist im Zellzyklus nahezu unverändert (Abb. 21B). Im Vergleich ist die Phosphataseaktivität von PP2A nach Knockdown von PP2A um ca. 50% reduziert (Abb. 21B). Effekte auf die durch PP2A regulierte Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 konnten durch den Knockdown von PP2A gezeigt werden (Abb. 12). Da die PP2A Aktivität im Zellzyklus im Verhältnis zum spezifischen Knockdown nahezu gleichbleibend höher ist (Abb. 21B), wird nicht von einer Zellzyklus regulierten Dephosphorylierung von NCoA-1 ausgegangen. Änderungen im Phosphorylierungslevel von NCoA-1 sind somit wahrscheinlich eher durch eine im Zellzyklus veränderte Phosphorylierung, vermutlich durch Cdk2, bedingt.

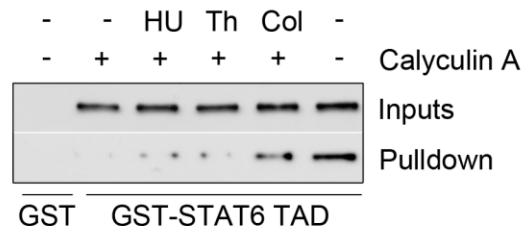
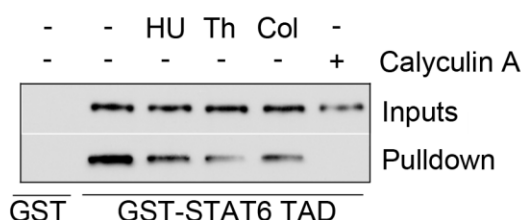
## A Phosphorylierung



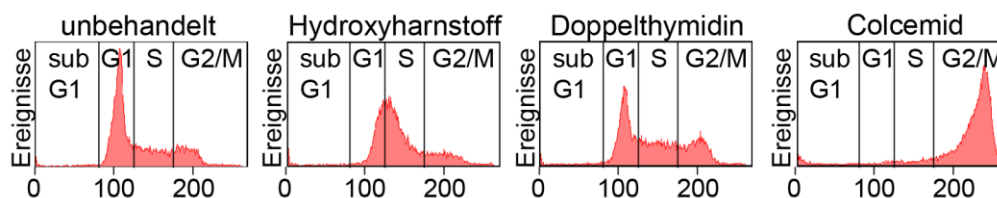
## B relative PP2A Aktivität



## C Pulldown



## D Zellzyklus



**Abb. 21: Zellzyklusabhängige Phosphorylierung von NCoA-1.** A) Phosphorylierung von NCoA-1. HEK 293T Zellen wurden bei 10%iger Konfluenz auf 10 cm Schalen mit je 1 µg NCoA-1 transfiziert und anschließend durch Doppelthymidinblock (1 mM) 2 x ü. N. und mit Hydroxyharnstoff (0,5 mM) und Colcemid (100 nM) ü. N. in Zellzyklusphasen blockiert. Die Zellen wurden mit 0,1 mCi mit  $P^{32}$  metabolisch markiert, NCoA-1 aus den NETN-Lysaten der Zellen präzipitiert und in die Autoradiographie, bzw. Westernblot eingesetzt. B) HEK 293T Zellen wurden bei 10% Konfluenz mit 10 nM unspezifischer, bzw. siRNA gegen PP2A transfiziert und anschließend wie in A) im Zellzyklus blockiert. Die Phosphataseaktivität von PP2A wurde in NETN-Extrakten ohne EDTA unter Hemmung anderer Phosphatasen durch 1 mM Orthovanadat und 0,5 nM Calyculin A gemessen. C) Pulldown von NCoA-1 aus Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Behandlung der Zellen wie in A) ohne Transfektion. NCoA-1 in den NETN-Extrakten wurde im Pulldown auf GST und GST-STAT6 Transaktivierungsdomäne eingesetzt. Als Input wurden 10% eingesetzt. Die Kontrolle des Zellzyklusblocks erfolgte jeweils durch die Messung des DNA-Gehalts mittels FACS Analyse nach Propidiumiodidfärbung.

Ob die Zellzyklus abhängige Phosphorylierung von NCoA-1 die Bindung von NCoA-1 mit STAT6 beeinflusst, wurde in GST-Pulldown Experimenten untersucht. NCoA-1 aus Zellzyklus arretierten Zellen wurde in die Interaktion mit GST-STAT6 TAD eingesetzt. Zum Vergleich wurden in Bezug auf den Zellzyklus unbehandelte Zellen mit Calyculin A behandelt. Parallel wurden Zellzyklus arretierte Zellen mit Calyculin A behandelt. In diesem Experiment sollte der Zellzyklus abhängige Phosphorylierungszustand von NCoA-1 ähnlich wie in Abb. 20 unter Inhibitorbehandlung untersucht werden. Anstatt der Verwendung des spezifischen Inhibitors Roscovitin sollte in diesem Experiment die Aktivität von Cdk2 durch die Arretierung der Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen reguliert werden.

Im Pulldownexperiment mit NCoA-1 aus Zellzyklus arretierten Zellen konnte keine spezifische Zellzyklusregulation der STAT6/ NCoA-1 Interaktion beobachtet werden (Abb. 21C links), obwohl NCoA-1 in den Zellzyklusphasen unterschiedlich stark phosphoryliert



vorliegt (Abb. 21A). Ein Zellzyklus abhängiger Effekt ist erst durch die parallele Behandlung der Zellzyklus arretierten Zellen mit Calyculin A zu erkennen. Die verminderte Bindung von NCoA-1 an STAT6 durch Calyculin A Behandlung kann durch den Zellzyklusblock in der späten M Phase leicht revertiert werden (Abb. 21C rechts). Wie die Hemmung der Phosphorylierung von NCoA-1 durch Roscovitin (Abb. 20A), revertiert der Zellzyklusblock in der späten M Phase, in der Cdk2 nicht aktiv ist, die Calyculin A induzierte Schwächung der STAT6/ NCoA-1 Interaktion. Die Revertierung ist in Übereinstimmung mit dem in Abb. 21A nicht wesentlich veränderten Phosphorylierungslevel nicht vollständig. Durch die vorliegenden Ergebnisse wird von einer Cdk2 abhängigen Phosphorylierung von NCoA-1 ausgegangen, die unter physiologischen Bedingungen Zellzyklus abhängig ist, aber die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 nicht beeinflusst. Ein Effekt der Cdk2 vermittelten Phosphorylierung, die vermutlich über die *in silico* identifizierte Aminosäure als Substrat hinaus geht (Abb. 10B), ist unter Calyculin A Behandlung zu beobachten. Cdk2 und PP2A werden daher als Gegenspieler bei der Rekrutierung von NCoA-1 durch den Transkriptionsfaktor STAT6 postuliert.

## 8 Diskussion

IL-4 führt zur Tyrosinphosphorylierung von STAT6, wodurch es dimerisiert und im Zellkern die Expression seiner Zielgene reguliert. Die IL-4 regulierte Transkriptionsaktivierung ist für die B- und T-Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung. Durch IL-4 Stimulation wird z. B. in B-Zellen Ig-Epsilon STAT6 abhängig exprimiert, (Schindler, Kashleva et al. 1994), das ein wichtiges Gen für die Differenzierung ist. Neben dem klassischen JAK/ STAT Signalweg zur Tyrosinphosphorylierung von STAT6 wurde ein weiterer Serin-/ Threoninkinasen abhängiger Mechanismus für die IL-4 aktivierte Genregulation postuliert [Pesu 2000], [Pesu 2002]. Die Zielstrukturen, die in diesem Prozeß relevant sind und die beteiligten Kinasen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Serin-/ Threoninphosphorylierung in der STAT6 getriebenen Genregulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß NCoA-1, ein essentieller Koaktivator im Transaktivierungsprozess von STAT6 durch die Phosphatase PP2A dephosphoryliert wird. Diese Dephosphorylierung spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6, sowie in der IL-4 regulierten Genregulation. Weiter konnte gezeigt werden, daß NCoA-1 Zellzyklus abhängig phosphoryliert wird. Die dynamische De-/ Phosphorylierung von NCoA-1 konnte somit als wichtiger Regulationsmechanismus in der IL-4 induzierten Genregulation identifiziert und charakterisiert werden.

### 8.1 Funktion der Phosphorylierung von STAT6 und NCoA-1

Neben der klassischen Tyrosinphosphorylierung von STAT6 durch IL-4 wurde ein Beitrag von Serin-/ Threonin-Kinasen aktivierenden Signalwegen an der STAT6 vermittelten Transkription angenommen. Die IL-4 induzierte Serinphosphorylierung in der TAD von STAT6 moduliert dessen Transkriptionsaktivierung, ist aber nur bedingt Voraussetzung für die Transkriptionsaktivierung (Pesu, Aittomaki et al. 2002). Die STAT6 phosphorylierende Kinase konnte nicht identifiziert werden. Unterschiedliche, teils durch IL-4 aktivierte Kinasen sind neben den Januskinasen an der STAT6 vermittelten Transkription beteiligt [Deszo, 2004] (Pesu, Aittomaki et al. 2002). Ihre Wirkungsweise bzw. die Zielstrukturen, die zu einer Beeinflussung der IL-4/ STAT6 abhängigen Transkriptionsregulation führen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Serin-/ Threoninphosphorylierung in der STAT6 vermittelten Transkription untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der für STAT6 wichtige Koaktivator NCoA-1 durch PP2A dephosphoryliert wird und daß diese Dephosphorylierung wichtig für die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 ist. Als modifikationsabhängige Rekrutierung eines Koaktivators an die STAT Proteine war bislang nur die Regulation der CBP/ STAT3 Interaktion beschrieben. Diese wird durch die Phosphorylierung von STAT3 moduliert (Schuringa, Schepers et al. 2001).

Die IL-4 Stimulation von humanen B Zellen führt zur Aktivierung und Serinphosphorylierung von STAT6, reguliert aber nicht die Interaktion mit NCoA-1 aus Gesamtzelllysaten, wie in KoIP und GST-Pulldown-Experimenten gezeigt werden konnte (Abb. 4, 5 und 11). Im Gegensatz zu STAT6 wird das Phosphorylierungslevel von NCoA-1 nicht durch die Stimulation der Zellen mit IL-4 verändert (Abb. 7).

Durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren für zelluläre Kinasen und Phosphatasen konnte gezeigt werden, daß die Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A zu einer Hyperphosphorylierung von STAT6, aber auch von NCoA-1 führt (Abb. 7). Die Behandlung von Zellen mit Calyculin A hemmt die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 (Abb. 5, 11, 20). Kinaseinhibitoren hemmen dagegen nicht die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 (Abb. 5, 20). Die in der Literatur beschriebene Beeinflussung der STAT6 vermittelten Transkription durch Kinaseinhibitoren (Canfield, Lee et al. 2005) (Deszo, Brake et al. 2004) (Pesu, Aittomaki et al. 2002) beruht daher offensichtlich nicht auf einer Hemmung der NCoA-1/STAT6 Interaktion. Diese Kinasen und auch die IL-4 Stimulation haben somit keinen Einfluß auf die Rekrutierung von NCoA-1 durch STAT6.

Sowohl NCoA-1 als auch STAT6 zeigen nach Calyculin A Behandlung von verschiedenen Zelllinien eine veränderte Elektromobilität. Diese wird bei allen getesteten Zelllinien durch Calyculin A induziert (Abb. 6) und geht mit einer Hyperphosphorylierung von STAT6 und NCoA-1 einher (Abb. 7). Im Vergleich der verwendeten Zelllinien untereinander ist die induzierte Änderung der Elektromobilität von NCoA-1 und STAT6 unterschiedlich stark (Abb. 6). Die durch Calyculin A induzierte Veränderung der Elektromobilität von NCoA-1 wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Sie könnte neben der Hyperphosphorylierung auch durch weitere Modifikationen bedingt sein. So wurde für NCoA-3 eine phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung beschrieben (Wu, Feng et al. 2007). Die bereits beschriebene Sumoylierung von NCoA-1 (Chauchereau, Amazit et al. 2003) wird nicht durch Calyculin A Behandlung der Zellen verändert und die Ubiquitinierung von NCoA-1 wird ebenfalls nicht durch die induzierte Hyperphosphorylierung reguliert (analysiert, aber nicht gezeigt). Inwieweit andere Modifikationen durch die Calyculin A Behandlung eingeführt werden, muß noch geklärt werden. Neben der Hauptfraktion von NCoA-1 wurden in Ramos B Zellen schnellere und langsamere Fraktionen von NCoA-1 detektiert (Abb. 6). Diese stark unterrepräsentierten Fraktionen von NCoA-1 können Isoformen darstellen oder durch unterschiedlich starke Phosphorylierungen in ihrer Elektromobilität verändert sein. Handelt es sich bei den unterschiedlich mobilen NCoA-1 Formen und unterschiedlich stark phosphoryliertes NCoA-1, so würde diese Variante unter physiologischen Bedingungen unterrepräsentiert sein und erst durch die Calyculin A Behandlung angereichert werden.

Die IL-4 oder Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung von STAT6 zeigt im Gegensatz zu der Calyculin A induzierten Hyperphosphorylierung von NCoA-1 im GST-Pulldown keinen Einfluß auf die Interaktion (Abb. 11B). Obwohl die Serin-/Threoninphosphorylierung von STAT6 zunächst als Regulationsmechanismus vermutet wurde, konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Hyperphosphorylierung von NCoA-1 und nicht die von STAT6 deren Interaktion inhibiert (Abb. 11B). Die Hemmung der Interaktion von NCoA-1 an STAT6 ist spezifisch, da die Bindung von NCoA-1 an den Östrogenrezeptor nicht reguliert wird, bzw. leicht verstärkt wird (Abb. 11B).

## 8.2 Charakterisierung der Phosphorylierung von NCoA-1

NCoA-1 wird an den Aminosäuren Ser-372, Ser-395, Ser-517, Ser-569, Ser-1033, Thr-1179 und Ser-1185 teils stimulusabhängig phosphoryliert (Rowan, Weigel et al. 2000). Die Wirkung dieser Phosphorylierungsereignisse wurde teilweise charakterisiert. Die Phosphorylierungen regulieren die Transkriptionsaktivierung durch verschiedene nukleäre Hormonrezeptoren (Li and Shang 2007). So konnte eine Aktivierung der Progesteronrezeptor abhängigen Transkription durch phosphoryliertes NCoA-1 gezeigt werden. Die MAP-Kinase und die Protein Kinase A abhängige Phosphorylierung von NCoA-1 findet vorwiegend in der glutaminreichen Region (Aminosäuren Threonin 1179 und Serin 1185) statt. Eine phosphorylierungsabhängige Regulation der Interaktion von NCoA-1 mit dem Progesteronrezeptor wurde aber nicht gefunden (Rowan, Garrison et al. 2000). Die in der betreffenden Arbeit charakterisierten Phosphorylierungsmutanten wurden auch in dieser Arbeit auf die Interaktion mit STAT6 untersucht. Es konnte aber kein Einfluß von Threonin 1179 oder Serin 1185 von NCoA-1 auf die Interaktion von NCoA-1 mit STAT6 beobachtet werden (nicht gezeigt). In einer weiteren Studie wurde Cdk2 als NCoA-1 phosphorylierende Kinase identifiziert. Die Phosphorylierung durch Cdk2 an nicht charakterisierten Aminosäuren in NCoA-1 verstärkt die Interaktion mit dem Progesteronrezeptor. Dies führt zu einer verstärkten Transkription über den Progesteronrezeptor (Narayanan, Adigun et al. 2005).

NCoA-1 wird nach Calyculin A Behandlung von Zellen speziell in den Regionen hyperphosphoryliert, die die Interaktion mit verschiedenen Proteinen vermitteln. Dies sind die PAS Domäne, die die Interaktion mit STAT6 und zwischen NCoA Proteinen vermittelt, die NID, die die Bindung an die nukleären Hormonrezeptoren vermittelt und die CID, die die Interaktion mit CBP vermittelt (Abb. 10B). Neben den in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungsstellen kann also durch die Effekte der Calyculin A Behandlung von weiteren Phosphorylierungsereignissen in der NID und der CID ausgegangen werden.

Der mit STAT6 interagierende minimale Bereich von NCoA-1 (AS 260-370) (Razeto, Ramakrishnan et al. 2004) wird nicht Calyculin A induziert hyperphosphoryliert (Abb. 10B).

Die phosphorylierten Aminosäuren, scheinen daher außerhalb der direkten Interaktionsfläche zu liegen. Die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 wird hauptsächlich durch ein LXXLL-Motiv in der TAD von STAT6 vermittelt (Litterst and Pfitzner 2002). Weitere Untersuchungen zur Affinität der Bindung von NCoA-1 und STAT6 mit Peptiden aus dieser Region zeigten, daß angrenzende Bereiche zum STAT6 LXXLL-Motiv die Interaktion mit NCoA-1 verstärken (Seitz, Maillard et al. 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Interaktionsfläche zwischen NCoA-1 und STAT6 größer ist als die Fläche, die für die Strukturanalyse verwendeten minimalen Proteinfragmente. Es wird vermutet, daß Bereiche von NCoA-1 außerhalb der Minimalregion einen Einfluß auf die Interaktion haben. Welche Bereiche ausschlaggebend sind und welche Aminosäuren phosphoryliert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ansatzweise untersucht.

Die bereits als phosphoryliert beschriebenen Aminosäuren Ser-372 und Ser-395 liegen in der PAS Domäne, die nach Calyculinbehandlung verstärkt phosphoryliert wird. Im Bereich AS 1-260 und 260-370 wurde keine Calyculin A induzierte Phosphorylierung beobachtet (Abb. 10B). Es wird daher angenommen, daß die im Bereich AS 213-462 induzierte Phosphorylierung überwiegend C-terminal zu dem für die Interaktion mit STAT6 identifizierten wichtigen Minimalbereich (Razeto, Ramakrishnan et al. 2004) liegt. In diesem Bereich konnte *in silico* das Serin 395 als potentiell durch Cdk2 phosphorylierte Aminosäure vorausgesagt werden. Eine Phosphorylierung des Serin 395 wurde darüber hinaus teils Calyculin A abhängig in der massenspektrometrischen Untersuchung in dieser Arbeit im Rahmen einer Kooperation nachgewiesen. Die Mutation von Serin 395, das angrenzend zum Kerninteraktionsbereich von NCoA-1 liegt, führte nicht zu einer veränderten Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 in GST-Pulldown Experimenten (Abb. 19A). Allerdings zeigt diese Mutation Einfluß auf die STAT6 vermittelte Transkription (Abb.19B). Daher kann von einer Beteiligung des Serin 395 an der Koaktivatorkomplexassemblierung bzw. an der regulierten Interaktion von NCoA-1 mit der basalen Transkriptionsmaschinerie vermutet werden.

Neben der Bindung an CBP vermitteln die CIDs der NCoAs durch Bindung an die PAS Domänen von anderen NCoA Proteinen deren Interaktion und Dimerisierung (Lodrini, Munz et al. 2008). Eine Kompetition zwischen der CID der NCoAs und der STAT6 TAD um die Bindung an die PAS Domäne von NCoA-1 konnte bereits gezeigt werden. Neben der Phosphorylierung der PAS Domäne könnte durch Calyculin A eine Phosphorylierung der CID induziert werden. Dies könnte die Affinität der CID zur PAS Domäne verstärken und so die Interaktion der PAS Domäne mit STAT6 blockieren. Die Untersuchung der Interaktionen zwischen den NCoA Koaktivatoren im Vergleich mit und ohne Calyculin A induzierte Hyperphosphorylierung ergab allerdings in Bezug auf diese Annahme bisher keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. 17B).

Für NCoA-3 wurde gefunden, daß mehrere Phosphorylierungsstellen im Protein für die Interaktion und Transkriptionsaktivierung mit und am Östrogen- sowie dem Androgenrezeptor von Bedeutung sind (Wu, Qin et al. 2004). Dabei sind auch Aminosäuren von Bedeutung, die nicht in den Interaktionsflächen liegen. Da diese Aminosäuren in Bereichen liegen, die für die Interaktion mit CBP wichtig sind, muss davon ausgegangen werden, daß die Phosphorylierungen die Bildung eines intakten Koaktivator-Komplexes beeinflusst. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Calyculin A induzierten NCoA-1 Hyperphosphorylierung vorliegen.

Die Hyperphosphorylierung der PAS Domäne alleine inhibiert nicht die Interaktion mit STAT6 (analysiert, aber nicht gezeigt). Die PAS Domäne von NCoA-1 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsaktivierung anderer Transkriptionsfaktoren (Liu, Wong et al. 2001), (Privalsky, Lee et al. 2009), ohne direkt die Interaktion zu vermitteln. So könnte prinzipiell durch verstärkte Phosphorylierung die Interaktion von NCoA-1 mit anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden, was dann indirekt eine Auswirkung auf die Interaktion mit STAT6 hat.

Zelluläres NCoA-1 bindet im Pulldown deutlich stärker als *in vitro* translatiertes an STAT6 (Abb. 21A). Hieraus wird klar, daß entweder der physiologische Phosphorylierungszustand von NCoA-1 in Zellen, oder weitere Proteine die Interaktion mit STAT6 stabilisieren und evtl. regulieren. Für die nukleären Hormonrezeptoren konnte gezeigt werden, daß NCoA-1 und CBP zusammen die Transkription aktivieren (Torchia, Rose et al. 1997; Liu, Wong et al. 2001; Sheppard, Harries et al. 2001). Ob die Rekrutierung von CBP an STAT6 durch NCoA-1 reguliert wird, wurde bislang nicht intensiv untersucht. Durch KoIP Experimente konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, daß die Hemmung der NCoA-1/ STAT6 Interaktion durch Calyculin A die Rekrutierung von CBP an STAT6 beeinflusst (Abb. 17A). Außerdem konnte kein eindeutiger Einfluß der Calyculin A induzierten Hyperphosphorylierung von NCoA-1 auf die Interaktion von NCoA-1 mit CBP gezeigt werden (Abb. 17A). Im Rahmen der untersuchten STAT6 Koaktivatoren (CBP, NCoA-1, NCoA-3, P100) konnte nur für die Rekrutierung von NCoA-1 durch STAT6 eine Regulation durch De-/ Phosphorylierung nachgewiesen werden. Durch welchen Mechanismus die Phosphorylierung von NCoA-1 die Interaktion mit STAT6 inhibiert, muss in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden. Eine Änderung der Konformation von NCoA-1 oder die Beteiligung weiterer Proteine an der Regulation der Interaktion stellen mögliche Ansatzpunkte dar. Als möglicher Mechanismus für die Regulation der Transkription über STAT6 ist auch die Kontaktierung der basalen Transkriptionsmaschinerie denkbar, die im Fall durch NCoA-1 vermittelt werden kann (Takeshita, Yen et al. 1996).

### 8.3 Regulation der NCoA-1 Phosphorylierung

In sehr hohen Konzentrationen hemmt Calyculin A die STAT6 DNA-Bindung. Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 15 C). Dieser Mechanismus war auch für die verringerte STAT6 abhängige Transkription als ursächlich postuliert worden [Maiti; 2005] [Woetmann; 2003]. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, daß die Hemmung der Interaktion zwischen STAT6 und seinem Koaktivator sehr viel wahrscheinlicher für die Regulation der IL-4 abhängigen Transkription durch Phosphatasen verantwortlich ist.

Calyculin A inhibiert PP2A, aber auch PP1. PP2A war bereits als Regulator für die STAT6 vermittelte Transkription vermutet worden (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Durch die Verwendung von spezifischen siRNAs konnte PP2A als essentieller Regulator der NCoA-1/ STAT6 Interaktion in KoIP und GST-Pulldown-Experimenten bestätigt werden (Abb. 12). Bislang war für PP2A lediglich ein Einfluß auf die Stabilität von NCoA-3 beschrieben worden. PP2A reguliert die Stabilität von NCoA-3 und damit die Verfügbarkeit als Transkriptionskoaktivator an den nukleären Hormonrezeptoren (Li, Liang et al. 2008). Auch in dieser Arbeit wurde die Interaktion von NCoA-3 mit der katalytischen Domäne von PP2A beobachtet (Abb. 9). Die Dephosphorylierung von NCoA-1 und die damit verbundene Regulation durch PP2A konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die katalytische Domäne von PP2A interagiert mit NCoA-1 in Protein-Protein Interaktionsstudien (Abb. 9) und aus Zellen präzipitiertes PP2A dephosphoryliert NCoA-1 (Abb. 8). Die spezifische Regulation der NCoA-1/ STAT6 Interaktion durch PP2A konnte durch die Verringerung von PP2A Aktivität mittels spezifischer siRNA in KoIP und GST-Pulldown-Experimenten gezeigt werden (Abb. 12). PP2A hält NCoA-1 dephosphoryliert. Erst durch die Hemmung der Phosphataseaktivität kommt es zur Akkumulation der Phosphorylierungen, die unter anderem spezifisch die STAT6/ NCoA-1 Interaktion inhibieren.

Die katalytische Untereinheit von PP2A kann durch unterschiedliche Stimuli unter anderem auch von JAK2 [Fuhrer, 1996] modifiziert werden. Dies führt zu einer Modulation der katalytischen Aktivität, sowie zu unterschiedlichen Substratspezifitäten durch die Bindung von unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten im Holoenzymkomplex [Longin 2007] [Virshup 2009]. Die IL-4 Stimulation führt in B Zellen zur Aktivierung von JAK2 und nachfolgend STAT6. Von daher wäre eine Regulation von PP2A durch IL-4 möglich. Da die Interaktion von NCoA-1 an die katalytische Untereinheit von PP2A durch die regulatorischen Untereinheiten vermittelt wird, müssten diese im GST-Pulldown (Abb. 9B) stabilisierend wirken. Durch die radioaktive Markierung von NCoA-1 konnte allerdings gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von NCoA-1 nicht durch IL-4 reguliert wird (Abb. 7). Eine IL-4

regulierte Rekrutierung des gesamten zellulären NCoA-1 an STAT6, wurde ebenfalls nicht beobachtet (Abb. 4, 5, und 11).

Es wurde bereits berichtet, daß PP2A an das TATA-Box Bindeprotein bindet und dadurch an die Promotoren vieler Gene rekrutiert wird (Xing, Vanderford et al. 2008). PP2A wirkt demnach in Transkriptionskomplexen und kann somit lokal wirken. PP2A ist fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 16B) und die Phosphataseaktivität ist im Kern sehr gering (nicht gezeigt). Die katalytische Untereinheit von PP2A akkumuliert aber IL-4 reguliert im Zellkern und könnte dort an STAT6 und NCoA-1 enthaltenden Transkriptionskomplexen wirken (Abb. 16B). Die Promotorbindung von PP2A an SOCS-1, einem STAT6 Zielgen konnte aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 16C). PP2A dephosphoryliert NCoA-1 *in vitro*. Ob die IL-4 Behandlung der Zellen die PP2A katalysierte Dephosphorylierung reguliert, wurde nicht untersucht und IL-4 führt nicht zur Dephosphorylierung von NCoA-1 (Abb. 7). Daß PP2A lokal an durch STAT6 rekrutierten Transkriptionskomplexen wirkt, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Charakterisierung müsste die regulatorische Untereinheit identifiziert werden, die an der Dephosphorylierung von NCoA-1 beteiligt ist. Nach der Identifikation von PP2A als NCoA-1 dephosphorylierende Kinase stellte sich die Frage, welche Kinase die Phosphorylierung von NCoA-1 vermittelt, die zu einer Hemmung der NCoA-1/ STAT6 Interaktion führt.

Da NCoA-1 nicht IL-4 induziert phosphoryliert wird, wurde ein Ansatz gewählt, in dem durch Einsatz von Kinaseinhibitoren die NCoA-1 phosphorylierende Kinase über ihre Wirkung auf die Calyculin A induzierten Hyperphosphorylierung und Interaktionshemmung identifiziert werden konnte. Cdk2 war bereits als NCoA-1 phosphorylierende Kinase bekannt (Narayanan, Adigun et al. 2005). Cdk2 aktiviert die Transkription am Progesteronrezeptor durch Phosphorylierung von NCoA-1. Durch die Hemmung von Cdk2 mit Roscovitin konnte allerdings ebenso wie mit den anderen Kinaseinhibitoren keine Regulation der Phosphorylierung von NCoA-1 beobachtet werden. Die Phosphorylierung von NCoA-1, die zur Hemmung der Interaktion mit STAT6 führt, wird nur bei gleichzeitiger Hemmung von Phosphatasen durch Calyculin A sichtbar. Durch die Kombination der Hemmung von PP2A und der Hemmung von Cdk2 konnte die antagonistische Regulation der Phosphorylierung von NCoA-1 durch die Kinase und die Phosphatase deutlich gemacht werden (Abb. 20).

In wachsenden Zellpopulationen ist Cdk2 in der G1- und der S-Phase aktiv und kann unter Calyculin A Behandlung zur Hyperphosphorylierung von NCoA-1 beitragen, während sie in der späten M-Phase nicht aktiv ist. Durch die Blockierung der Zellen in der G1- oder der S-Phase konnte eine leichte Verstärkung der NCoA-1 Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 21A). Die zelluläre Phosphataseaktivität verhindert aber eine starke Hyperphosphorylierung. Die Blockierung der Zellen in der M-Phase zeigt keinen Effekt im



Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ob die STAT6 vermittelte Transkription zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus durch die unterschiedliche Aktivität von Cdk2 reguliert wird, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß im Rahmen des Zellzyklus generell die Transkription zu bestimmten Phasen eingestellt wird.

#### **8.4 Bedeutung der NCoA-1 Phosphorylierung in der Transkriptionsregulation durch STAT6**

Die Koaktivatorkomplexassemblierung während der Transkriptionsregulation ist ein dynamischer Prozess [Metivier; 2003]. In bisherigen Untersuchungen wurde vor allem die Funktion der Serinphosphorylierung der TAD von STAT6 in der IL-4 induzierten Transkriptionsaktivierung untersucht. Hierbei wurden sowohl Inhibitoren als auch Mutanten von STAT6 in Bezug auf diesen Zusammenhang untersucht (Pesu, Takaluoma et al. 2000) (Pesu, Aittomaki et al. 2002) (Maiti, Sharma et al. 2005). Die STAT6 getriebene Transkriptionsaktivierung ist abhängig von zellulärer Serin-/ Threoninphosphataseaktivität und kann durch Phosphataseinhibitoren in Reportergenexperimenten gehemmt werden (Abb. 13A). Dies wurde bereits beschrieben. Als Mechanismus wurde aber eine gehemmte DNA-Bindung von STAT6 nach Inhibitorbehandlung angenommen (Woetmann, Brockdorff et al. 2003). Die in der betreffenden Arbeit verwendeten Inhibitorkonzentrationen waren allerdings sehr hoch. Durch hohe Konzentrationen an Serin-/ Threoninphosphataseinhibitoren kann die Tyrosinphosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 und STAT5 gehemmt werden (Woetmann, Nielsen et al. 1999) (Ross, Cheng et al. 2009). Das konnte in dieser Arbeit auch bei STAT6 beobachtet werden (Abb. 15C). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Transkriptionsaktivierung wurden niedrigere Konzentrationen eingesetzt, bei denen eine spezifischere Wirkung erwartet werden kann. Diese wurden sowohl bei den Reportergenexperimenten als auch für die Untersuchung zur Expression von endogenen Zielgenen verwendet. Bei diesen Konzentrationen wurden weder die STAT6 Aktivierung, noch die DNA-Bindung inhibiert (Abb. 13B/ 15C). Bei Zugabe von 0,5 nM Okadasäure ist die STAT6 vermittelte Transkription bereits stark reduziert ist (Abb.13A). In dieser Konzentration wird überwiegend PP2A inhbiert, PP1 aber fast nicht gehemmt (Cohen, Holmes et al. 1990). PTP1B, eine die STAT6 Aktivierung hemmende Phosphatase (Lu, Malumbres et al. 2008), wird nicht gehemmt.

Durch Verwendung niedrigerer Inhibitiorkonzentrationen kann eine spezifische Beteiligung von PP2A an der STAT6 vermittelten Transkription angenommen werden, da niedrigere Konzentrationen von Calyculin A, die bereits PP1, aber nicht PP2A inhibieren, keine deutliche Inhibierung der Reportergenaktivität zeigen (Abb. 13A). Eine unspezifische

Toxizität konnte durch die Reporter-genexperimente am Östrogenrezeptor ausgeschlossen werden. Da NCoA-1 auch den Kontakt zur basalen Transkriptionsmaschinerie herstellt (Takeshita, Yen et al. 1996), könnte die Inhibition der STAT6 vermittelten Transkription durch diesen Mechanismus bedingt sein. Der Östrogenrezeptor hingegen interagiert auch direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (Redeuilh, Attia et al. 2002). Die Östrogenrezeptor vermittelte Transkription wäre von einer Phosphorylierung von NCoA-1, die die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie reguliert, somit potentiell nicht betroffen. Eine veränderte Rekrutierung von NCoA-1 an den Östrogenrezeptor wird nicht vermutet, da diese im Pulldownexperiment nicht eindeutig beobachtet wurde (Abb. 11C). Bezüglich der Wirkung von Phosphataseinhibitoren auf den JAK/STAT Signalweg wurde neben der hemmenden Wirkung der Phosphataseinhibitoren auch eine Aktivierung von JAK2, das auch STAT6 phosphorylieren kann, durch Okadasäure berichtet (Yokoyama, Reich et al. 2001). Eine aktivierende Wirkung von Calyculin A auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT6 wurde in dieser Arbeit aber nicht beobachtet (13B/ 15C).

Um potentielle unspezifische Effekte durch die Phosphataseinhibitoren zu vermeiden, wurde die Abhängigkeit der STAT6 vermittelten Transkription vom zellulären PP2A Level untersucht. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte eine direkte Abhängigkeit der STAT6 vermittelten Transkription von PP2A nachgewiesen werden (Abb. 14A), die mit einer PP2A abhängigen Interaktion von NCoA-1 und STAT6 einhergeht (Abb. 12). Sowohl in Reporter-genexperimenten als auch auf der Ebene der Expression der endogenen Zielgene Ig-Epsilon und TARC konnte die Funktion von PP2A in der STAT6 vermittelten Transkriptionsaktivierung nachgewiesen werden. Die aktivierende Wirkung von NCoA-1 auf die STAT6 vermittelte Transkription konnte durch spezifischen Knockdown und durch Überexpression von NCoA-1 in Reporter-genexperimenten bestätigt werden (Abb. 14B/ 19B). In früheren Arbeiten konnte für NCoA-1 gezeigt werden, daß die PAS Domäne sowohl die Interaktion mit STAT6 als auch die Interaktion zwischen NCoA Koaktivatoren über deren CID Domäne vermittelt (Lodrini, Munz et al. 2008). Dies bedeutet, daß es während der IL-4 induzierten Transkriptionsaktivierung zu einer Veränderung der möglichen Interaktionen zwischen Koaktivatoren und STAT6 kommen kann. Eine Möglichkeit solche Umlagerungen zu regulieren sind posttranslationale Modifikationen. Die Interaktion der NCoA Proteine wird in KoIP Experimenten nicht deutlich durch die Calyculin A Behandlung reguliert (Abb. 17B). Veränderte Affinitäten der Koaktivatoren untereinander sind sicher im Kontext der gesamten Transkriptionsmaschinerie zu vermuten. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, daß die Rekrutierung von Koaktivatoren am Promotor dynamisch erfolgt und daher wohl im KoIP Experiment nicht nachweisbar ist. In dieser Arbeit konnte die dynamische Rekrutierung von STAT6 auf den Zielgenen Ig-Epsilon und TARC mittels Chromatinimmunpräzipitation

wahrscheinlich methodisch bedingt nicht nachgewiesen werden. Daher wurde die Bindung von STAT6 und NCoA-1 auf SOCS-1, einem schnell induzierten Zielgen von STAT6 nachgewiesen (Abb. 16C). Es wurde ebenfalls untersucht ob PP2A gemeinsam mit NCoA-1 STAT6 abhängig auf den SOCS-1 Promoter rekrutiert werden kann. Eine spezifische Bindung von PP2A konnte in der Chromatinimmunpräzipitation nicht nachgewiesen werden. Die für die Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 essentielle Dephosphorylierung von NCoA-1 findet also entweder nicht am Promotor statt oder PP2A ist nicht am SOCS Promotor nachweisbar. Dies könnte auch methodische Ursachen haben, da bei der Chromatinimmunopräzipitation nicht alle Epitope eines Proteins zugänglich sind und der verwendete Antikörper gegen PP2A bisher nicht für Chromatinimmunpräzipitationsexperimente beschrieben wurde.

Die IL-4 induzierte Expression von endogenen STAT6 Zielgenen ist von NCoA-1 (Litterst and Pfitzner 2002) und von der NCoA-1 bindenden STAT6 TAD abhängig (Goenka, Marlar et al. 2003). Ramos B Zellen wurden als Modellsystem für die PP2A abhängige, STAT6 Zielgen getriebene Expression von Ig-Epsilon und TARC verwendet. Ramos B Zellen weisen ein geringes Expressionslevel von NCoA-1 auf. Die phosphorylierungsabhängige regulierte Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 kann somit in diesen Zellen gut untersucht werden, da NCoA-1 in limitierenden Mengen vorkommt. STAT6 wird in Ramos B Zellen durch IL-4 stark Tyrosin phosphoryliert und induziert die Expression der Zielgene um 370-fach (Ig-Epsilon), bzw. 100-fach (TARC) (Abb. 15A). Der selektive Knockdown von PP2A führt ebenso wie die Calyculin A Behandlung der Zellen zur Hemmung der Expression der STAT6 Zielgene. Dies korreliert in diesem Zellsystem mit der Hemmung der NCoA-1/STAT6 Interaktion. Damit konnte eindeutig eine Beteiligung von PP2A an der Regulation der IL-4 induzierten Genexpression nachgewiesen werden. Ob die Dephosphorylierung von NCoA-1 den Hauptregulationsmechanismus darstellt, kann erst nach Identifizierung der NCoA-1 Phosphorylierungsstellen und deren Mutation dargestellt werden.

Die Regulation von Koaktivatoren durch posttranslationale Modifikationen gewinnt in der Untersuchung der Transkriptionsregulation durch extrazelluläre Signale zunehmend an Bedeutung. Neben der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors hat die Regulation von Koaktivatoren eine zentrale integrative Bedeutung, da diese Faktoren von vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren gleichzeitig genutzt werden. Deren Rekrutierung zur Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes ist ein dynamischer Prozess, der durch Phosphorylierungen reguliert werden kann. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß dieser Mechanismus auch bei der Rekrutierung von NCoA-1 an STAT6 von Bedeutung ist. Die dynamische De-/ Phosphorylierung von NCoA-1 durch PP2A und Zellzyklus abhängige Kinasen wird als zusätzlicher Regulationsmechanismus der IL-4 induzierten der

STAT6 regulierten Transkription postuliert. Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der Regulation der IL-4 induzierten Genaktivierung bei und liefern die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Zellzyklus abhängigen Genregulation.

## 9 Literaturverzeichnis

- Akira, S. (1999). "Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice." *Stem Cells* **17**(3): 138-46.
- Ali, S., D. Metzger, J. M. Bornert and P. Chambon (1993). "Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region." *Embo J* **12**(3): 1153-60.
- Anzick, S. L., J. Kononen, R. L. Walker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X. Y. Guan, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, J. M. Trent and P. S. Meltzer (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." *Science* **277**(5328): 965-8.
- Apostolakis, E. M., M. Ramamurphy, D. Zhou, S. Onate and B. W. O'Malley (2002). "Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice." *Mol Endocrinol* **16**(7): 1511-23.
- Arimura, A., M. vn Peer, A. J. Schroder and P. B. Rothman (2004). "The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6." *J Biol Chem* **279**(30): 31105-12.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." *Nature* **384**(6610): 641-3.
- Baus, D., F. Nonnenmacher, S. Jankowski, C. Doring, C. Brautigam, M. Frank, M. L. Hansmann and E. Pfitzner (2009). "STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line." *Leukemia* **23**(10): 1885-93.
- Bienvenu, F., B. Barre, S. Giraud, S. Avril and O. Coqueret (2005). "Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1." *Mol Biol Cell* **16**(4): 1850-8.
- Brombacher, F. (2000). "The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy." *Bioessays* **22**(7): 646-56.
- Bromberg, J. and X. Chen (2001). "STAT proteins: signal transducers and activators of transcription." *Methods Enzymol* **333**: 138-51.
- Canfield, S., Y. Lee, A. Schroder and P. Rothman (2005). "Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK." *J Immunol* **174**(5): 2494-8.
- Chatila, T. A. (2004). "Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis." *Trends Mol Med* **10**(10): 493-9.
- Chauchereau, A., L. Amazit, M. Quesne, A. Guiochon-Mantel and E. Milgrom (2003). "Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1." *J Biol Chem* **278**(14): 12335-43.
- Chen, D., H. Ma, H. Hong, S. S. Koh, S. M. Huang, B. T. Schurter, D. W. Aswad and M. R. Stallcup (1999). "Regulation of transcription by a protein methyltransferase." *Science* **284**(5423): 2174-7.
- Chen, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani and R. M. Evans (1997). "Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300." *Cell* **90**(3): 569-80.
- Chen, J., B. L. Martin and D. L. Brautigan (1992). "Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation." *Science* **257**(5074): 1261-4.
- Cohen, P., C. F. Holmes and Y. Tsukitani (1990). "Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation." *Trends Biochem Sci* **15**(3): 98-102.
- Cohen, P. T., N. D. Brewis, V. Hughes and D. J. Mann (1990). "Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family." *FEBS Lett* **268**(2): 355-9.
- Corry, D. B. (2002). "Emerging immune targets for the therapy of allergic asthma." *Nat Rev Drug Discov* **1**(1): 55-64.
- Decker, T. and P. Kovarik (2000). "Serine phosphorylation of STATs." *Oncogene* **19**(21): 2628-37.

- Deszo, E. L., D. K. Brake, K. W. Kelley and G. G. Freund (2004). "IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKCdelta." Cell Signal **16**(2): 271-80.
- Duong, F. H., M. Filipowicz, M. Tripodi, N. La Monica and M. H. Heim (2004). "Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A." Gastroenterology **126**(1): 263-77.
- Dutertre, M. and C. L. Smith (2003). "Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains." Mol Endocrinol **17**(7): 1296-314.
- Eichhorn, P. J., M. P. Creighton and R. Bernards (2009). "Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer." Biochim Biophys Acta **1795**(1): 1-15.
- Gauss, C. M., J. E. Sheppeck, 2nd, A. C. Nairn and R. Chamberlin (1997). "A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A." Bioorg Med Chem **5**(9): 1751-73.
- Gigena, M. S., A. Ito, H. Nojima and T. B. Rogers (2005). "A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H285-94.
- Gingras, S., J. Simard, B. Groner and E. Pfitzner (1999). "p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6." Nucleic Acids Res **27**(13): 2722-9.
- Goenka, S., C. Marlar, U. Schindler and M. Boothby (2003). "Differential roles of C-terminal activation motifs in the establishment of Stat6 transcriptional specificity." J Biol Chem **278**(50): 50362-70.
- Grussenmeyer, T., A. Carbone-Wiley, K. H. Scheidtmann and G. Walter (1987). "Interactions between polyomavirus medium T antigen and three cellular proteins of 88, 61, and 37 kilodaltons." J Virol **61**(12): 3902-9.
- Han, S. J., D. M. Lonard and B. W. O'Malley (2009). "Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications." Trends Endocrinol Metab **20**(1): 8-15.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck and A. Duschl (2006). "Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6." Cytokine Growth Factor Rev **17**(3): 173-88.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare and M. G. Parker (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-6.
- Hershey, G. K. (2003). "IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 677-90; quiz 691.
- Hoang, T., I. S. Fenne, C. Cook, B. Borud, M. Bakke, E. A. Lien and G. Mellgren (2004). "cAMP-dependent protein kinase regulates ubiquitin-proteasome-mediated degradation and subcellular localization of the nuclear receptor coactivator GRIP1." J Biol Chem **279**(47): 49120-30.
- Hong, H., K. Kohli, A. Trivedi, D. L. Johnson and M. R. Stallcup (1996). "GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4948-52.
- Iribarren, P., K. Chen, J. Hu, X. Zhang, W. Gong and J. M. Wang (2005). "IL-4 inhibits the expression of mouse formyl peptide receptor 2, a receptor for amyloid beta1-42, in TNF-alpha-activated microglia." J Immunol **175**(9): 6100-6.
- Janssens, V. and J. Goris (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-39.
- Janssens, V., J. Goris and C. Van Hoof (2005). "PP2A: the expected tumor suppressor." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 34-41.

- Kalkhoven, E., J. E. Valentine, D. M. Heery and M. G. Parker (1998). "Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor." Embo J **17**(1): 232-43.
- Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-14.
- Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley and M. J. Grusby (1996). "Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells." Immunity **4**(3): 313-9.
- Koh, S. S., D. Chen, Y. H. Lee and M. R. Stallcup (2001). "Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities." J Biol Chem **276**(2): 1089-98.
- Kornberg, R. D. (2007). "The molecular basis of eukaryotic transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 12955-61.
- Lee, S. K., H. J. Kim, S. Y. Na, T. S. Kim, H. S. Choi, S. Y. Im and J. W. Lee (1998). "Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits." J Biol Chem **273**(27): 16651-4.
- Li, C., Y. Y. Liang, X. H. Feng, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (2008). "Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover." Mol Cell **31**(6): 835-49.
- Li, H., P. J. Gomes and J. D. Chen (1997). "RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8479-84.
- Li, S. and Y. Shang (2007). "Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications." Cell Signal **19**(6): 1101-12.
- Litterst, C. M., S. Kliem, D. Marilley and E. Pfitzner (2003). "NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain." J Biol Chem **278**(46): 45340-51.
- Litterst, C. M. and E. Pfitzner (2001). "Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1." J Biol Chem **276**(49): 45713-21.
- Litterst, C. M. and E. Pfitzner (2002). "An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1." J Biol Chem **277**(39): 36052-60.
- Liu, Z., J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (2001). "Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12426-31.
- Lodrini, M., T. Munz, N. Coudeville, C. Griesinger, S. Becker and E. Pfitzner (2008). "P160/SRC/NCoA coactivators form complexes via specific interaction of their PAS-B domain with the CID/AD1 domain." Nucleic Acids Res **36**(6): 1847-60.
- Longin, S., K. Zwaenepoel, J. V. Louis, S. Dilworth, J. Goris and V. Janssens (2007). "Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit." J Biol Chem **282**(37): 26971-80.
- Longin, S., K. Zwaenepoel, E. Martens, J. V. Louis, E. Rondelez, J. Goris and V. Janssens (2008). "Spatial control of protein phosphatase 2A (de)methylation." Exp Cell Res **314**(1): 68-81.
- Lu, B., M. Reichel, D. A. Fisher, J. F. Smith and P. Rothman (1997). "Identification of a STAT6 domain required for IL-4-induced activation of transcription." J Immunol **159**(3): 1255-64.
- Lu, Q., H. K. Surks, H. Ebling, W. E. Baur, D. Brown, D. C. Pallas and R. H. Karas (2003). "Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2A." J Biol Chem **278**(7): 4639-45.
- Lu, X., R. Malumbres, B. Shields, X. Jiang, K. A. Sarosiek, Y. Natkunam, T. Tiganis and I. S. Lossos (2008). "PTP1B is a negative regulator of interleukin 4-induced STAT6 signaling." Blood **112**(10): 4098-108.

- Maiti, N. R., P. Sharma, P. C. Harbor and S. J. Haque (2005). "Serine phosphorylation of Stat6 negatively controls its DNA-binding function." *J Interferon Cytokine Res* **25**(9): 553-63.
- McDonald, C. and N. C. Reich (1999). "Cooperation of the transcriptional coactivators CBP and p300 with Stat6." *J Interferon Cytokine Res* **19**(7): 711-22.
- Meyer, M. E., H. Gronemeyer, B. Turcotte, M. T. Bocquel, D. Tasset and P. Chambon (1989). "Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function." *Cell* **57**(3): 433-42.
- Mottok, A., C. Renne, K. Willenbrock, M. L. Hansmann and A. Brauninger (2007). "Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6." *Blood* **110**(9): 3387-90.
- Mukherjee, A., S. M. Soyal, R. Fernandez-Valdivia, M. Gehin, P. Chambon, F. J. Demayo, J. P. Lydon and B. W. O'Malley (2006). "Steroid receptor coactivator 2 is critical for progesterone-dependent uterine function and mammary morphogenesis in the mouse." *Mol Cell Biol* **26**(17): 6571-83.
- Na, S. Y., S. K. Lee, S. J. Han, H. S. Choi, S. Y. Im and J. W. Lee (1998). "Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations." *J Biol Chem* **273**(18): 10831-4.
- Naeem, H., D. Cheng, Q. Zhao, C. Underhill, M. Tini, M. T. Bedford and J. Torchia (2007). "The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation." *Mol Cell Biol* **27**(1): 120-34.
- Narayanan, R., A. A. Adigun, D. P. Edwards and N. L. Weigel (2005). "Cyclin-dependent kinase activity is required for progesterone receptor function: novel role for cyclin A/Cdk2 as a progesterone receptor coactivator." *Mol Cell Biol* **25**(1): 264-77.
- O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." *Cell* **109** Suppl: S121-31.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-7.
- Pesu, M., S. Aittomaki, K. Takaluoma, A. Lagerstedt and O. Silvennoinen (2002). "p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription." *J Biol Chem* **277**(41): 38254-61.
- Pesu, M., K. Takaluoma, S. Aittomaki, A. Lagerstedt, K. Saksela, P. E. Kovanen and O. Silvennoinen (2000). "Interleukin-4-induced transcriptional activation by stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of stat6." *Blood* **95**(2): 494-502.
- Pilz, A., K. Ramsauer, H. Heidari, M. Leitges, P. Kovarik and T. Decker (2003). "Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons." *EMBO Rep* **4**(4): 368-73.
- Privalsky, M. L., S. Lee, J. B. Hahm, B. M. Young, R. N. Fong and I. H. Chan (2009). "The p160 coactivator PAS-B motif stabilizes nuclear receptor binding and contributes to isoform-specific regulation by thyroid hormone receptors." *J Biol Chem* **284**(29): 19554-63.
- Razeto, A., V. Ramakrishnan, C. M. Litterst, K. Giller, C. Griesinger, T. Carlomagno, N. Lakomek, T. Heimburg, M. Lodrini, E. Pfitzner and S. Becker (2004). "Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain." *J Mol Biol* **336**(2): 319-29.
- Redeuilh, G., A. Attia, J. Mester and M. Sabbah (2002). "Transcriptional activation by the oestrogen receptor alpha is modulated through inhibition of cyclin-dependent kinases." *Oncogene* **21**(37): 5773-82.
- Roeder, R. G. (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." *Trends Biochem Sci* **21**(9): 327-35.
- Ross, J. A., H. Cheng, Z. S. Nagy, J. A. Frost and R. A. Kirken (2009). "Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates interleukin-2 receptor complex formation and JAK3/STAT5 activation." *J Biol Chem*.



- Rowan, B. G., N. Garrison, N. L. Weigel and B. W. O'Malley (2000). "8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8720-30.
- Rowan, B. G., N. L. Weigel and B. W. O'Malley (2000). "Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* **275**(6): 4475-83.
- Ruediger, R., D. Roeckel, J. Fait, A. Bergqvist, G. Magnusson and G. Walter (1992). "Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus." *Mol Cell Biol* **12**(11): 4872-82.
- Ruediger, R., J. E. Van Wart Hood, M. Mumby and G. Walter (1991). "Constant expression and activity of protein phosphatase 2A in synchronized cells." *Mol Cell Biol* **11**(8): 4282-5.
- Saydam, G., H. H. Aydin, F. Sahin, N. Selvi, G. Oktem, E. Terzioglu, F. Buyukkececi and S. B. Omay (2003). "Involvement of protein phosphatase 2A in interferon-alpha-2b-induced apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukaemia cells." *Leuk Res* **27**(8): 709-17.
- Schindler, C., H. Kashleva, A. Pernis, R. Pine and P. Rothman (1994). "STF-IL-4: a novel IL-4-induced signal transducing factor." *Embo J* **13**(6): 1350-6.
- Schindler, C., D. E. Levy and T. Decker (2007). "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines." *J Biol Chem* **282**(28): 20059-63.
- Schuringa, J. J., H. Schepers, E. Vellenga and W. Kruijer (2001). "Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation." *FEBS Lett* **495**(1-2): 71-6.
- Seitz, M., L. T. Maillard, D. Obrecht and J. A. Robinson (2008). "Molecular characterization of the NCoA-1-STAT 6 interaction." *Chembiochem* **9**(8): 1318-22.
- Sharrocks, A. D., S. H. Yang and A. Galanis (2000). "Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases." *Trends Biochem Sci* **25**(9): 448-53.
- Sheppard, H. M., J. C. Harries, S. Hussain, C. Bevan and D. M. Heery (2001). "Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1." *Mol Cell Biol* **21**(1): 39-50.
- Shi, Y. (2009). "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure." *Cell* **139**(3): 468-84.
- Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul and J. N. Ihle (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." *Nature* **380**(6575): 630-3.
- Silver, D. L. and D. J. Montell (2003). "A new trick for Cyclin-Cdk: activation of STAT." *Dev Cell* **4**(2): 148-9.
- Smith, C. L., S. A. Onate, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1996). "CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 8884-8.
- Spencer, T. E., G. Jenster, M. M. Burcin, C. D. Allis, J. Zhou, C. A. Mizzen, N. J. McKenna, S. A. Onate, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1997). "Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase." *Nature* **389**(6647): 194-8.
- Sutton, B. J. and H. J. Gould (1993). "The human IgE network." *Nature* **366**(6454): 421-8.
- Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto and S. Akira (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." *Nature* **380**(6575): 627-30.
- Takeshita, A., G. R. Cardona, N. Koibuchi, C. S. Suen and W. W. Chin (1997). "TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1." *J Biol Chem* **272**(44): 27629-34.

- Takeshita, A., P. M. Yen, S. Misiti, G. R. Cardona, Y. Liu and W. W. Chin (1996). "Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator." Endocrinology **137**(8): 3594-7.
- Torchia, J., D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (1997). "The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function." Nature **387**(6634): 677-84.
- Ueda, T., N. R. Mawji, N. Bruchovsky and M. D. Sadar (2002). "Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38087-94.
- Valineva, T., J. Yang, R. Palovuori and O. Silvennoinen (2005). "The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6." J Biol Chem **280**(15): 14989-96.
- Voegel, J. J., M. J. Heine, M. Tini, V. Vivat, P. Chambon and H. Gronemeyer (1998). "The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways." Embo J **17**(2): 507-19.
- Voegel, J. J., M. J. Heine, C. Zechel, P. Chambon and H. Gronemeyer (1996). "TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors." Embo J **15**(14): 3667-75.
- Wang, Q., J. Lu and E. L. Yong (2001). "Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region." J Biol Chem **276**(10): 7493-9.
- Wang, Y., M. G. Malabarba, Z. S. Nagy and R. A. Kirken (2004). "Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function." J Biol Chem **279**(24): 25196-203.
- Westermarck, J. and W. C. Hahn (2008). "Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation." Trends Mol Med **14**(4): 152-60.
- Wick, K. R. and M. T. Berton (2000). "IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes." Mol Immunol **37**(11): 641-52.
- Woetmann, A., J. Brockdorff, P. Lovato, M. Nielsen, V. Leick, K. Rieneck, A. Svejgaard, C. Geisler and N. Odum (2003). "Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates interleukin-4-mediated STAT6 signaling." J Biol Chem **278**(5): 2787-91.
- Woetmann, A., M. Nielsen, S. T. Christensen, J. Brockdorff, K. Kaltoft, A. M. Engel, S. Skov, C. Brender, C. Geisler, A. Svejgaard, J. Rygaard, V. Leick and N. Odum (1999). "Inhibition of protein phosphatase 2A induces serine/threonine phosphorylation, subcellular redistribution, and functional inhibition of STAT3." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10620-5.
- Woychik, N. A. and M. Hampsey (2002). "The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function." Cell **108**(4): 453-63.
- Wu, R. C., Q. Feng, D. M. Lonard and B. W. O'Malley (2007). "SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock." Cell **129**(6): 1125-40.
- Wu, R. C., J. Qin, P. Yi, J. Wong, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (2004). "Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways." Mol Cell **15**(6): 937-49.
- Xing, H., N. L. Vanderford and K. D. Sarge (2008). "The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action." Nat Cell Biol **10**(11): 1318-23.
- Xu, J. and Q. Li (2003). "Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family." Mol Endocrinol **17**(9): 1681-92.
- Xu, J., L. Liao, G. Ning, H. Yoshida-Komiya, C. Deng and B. W. O'Malley (2000). "The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6379-84.

- Xu, J. and B. W. O'Malley (2002). "Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function." Rev Endocr Metab Disord **3**(3): 185-92.
- Xu, J., Y. Qiu, F. J. DeMayo, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1998). "Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene." Science **279**(5358): 1922-5.
- Xu, J., R. C. Wu and B. W. O'Malley (2009). "Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family." Nat Rev Cancer **9**(9): 615-30.
- Yalcin, A., E. Koulich, S. Mohamed, L. Liu and S. R. D'Mello (2003). "Apoptosis in cerebellar granule neurons is associated with reduced interaction between CREB-binding protein and NF-kappaB." J Neurochem **84**(2): 397-408.
- Yamashita, H., J. Xu, R. A. Erwin, W. L. Farrar, R. A. Kirken and H. Rui (1998). "Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells." J Biol Chem **273**(46): 30218-24.
- Yang, J., S. Aittomaki, M. Pesu, K. Carter, J. Saarinen, N. Kalkkinen, E. Kieff and O. Silvennoinen (2002). "Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II." Embo J **21**(18): 4950-8.
- Yokoyama, N., N. C. Reich and W. T. Miller (2001). "Involvement of protein phosphatase 2A in the interleukin-3-stimulated Jak2-Stat5 signaling pathway." J Interferon Cytokine Res **21**(6): 369-78.
- Zhang, X., J. Blenis, H. C. Li, C. Schindler and S. Chen-Kiang (1995). "Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes." Science **267**(5206): 1990-4.
- Zhao, H., R. Nakajima, H. Kunitomo, T. Sasaki, H. Kojima and K. Nakajima (2004). "Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **325**(2): 541-8.
- Zwijnen, R. M., R. S. Buckle, E. M. Hijmans, C. J. Loomans and R. Bernards (1998). "Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1." Genes Dev **12**(22): 3488-98.
- Zwijnen, R. M., E. Wientjens, R. Klompmaier, J. van der Sman, R. Bernards and R. J. Michalides (1997). "CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1." Cell **88**(3): 405-15.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(E)GFP	(Enhanced) Grün fluoreszierendes Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
AS	Aminosäure
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calyculin A
CARM1	Kofaktor assoziierte Arginin (R) Methyltransferase 1
CBP	Creb binding protein
cDNA	Complementary DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CID	CBP interaction domain
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quaratzentimeter
CoIP	Koimmunpräzipitation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
G	relative Erdbeschleunigung
GAS	γ Interferon activated sites
GST	Glutathion S-Transferase
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
h	Stunde
HAT	Histonazetyltransferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
In	Input
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCoA	Nuclear receptor coactivator
NID	Nuklear receptor interaction Domain
nM	Nonomolar
OD	Optische Dichte
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pas	Per-Arnt-Sin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	PD98059
Pol II CTD	C-terminale Domänen der RNA Polymerase II
PRMT	Protein Arginin ® Methyltransferase
Q-reich	glutaminreich

SB	SB202190
siRNA	small interfering RNA
SP	SP600125
St	Staurosporin
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAD	Transaktivierungsdomäne
U	Einheit (Unit)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Westernblot
WCE	Gesamtzelleextrakt
WT	Wildtyp

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen:

Lodrini, M., Munz, T., Coudeville, N., Griesinger, C., Becker, S. and Pfitzner, E.  
(2008) P160/SRC/NCoA coactivators form complexes via specific interaction of  
their PAS-B domain with the CID/AD1 domain. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1847-1860

Munz T, Litterst C. and Pfitzner E. Interaction of STAT6 with its coactivator is regulated by dephosphorylation of SRC-1/ NCoA-1 via PP2A. -In Vorbereitung-

## 12 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau Dr. habil. Edith Pfitzner für die Bereitstellung des Promotions-themas und die Arbeit in ihrem Labor durchführen zu können. Ich möchte mich für die wissenschaftliche Betreuung und die Diskussionsbereitschaft bedanken, die in anregenden Auseinandersetzungen oft neue Perspektiven eröffnet haben.

Ich möchte den weiteren Guachtern für die Begutachtung dieser Arbeit danken. Für die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit durchzuführen, möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Thorsten Heinzel danken. Herrn Dr. Schlott möchte ich für die massenspektrometrische Untersuchung als Beitrag zu dieser Arbeit danken.

Ich danke meinen Kollegen Frank, Xin und Christien für die gute Arbeitsathmosphäre und die Diskussionsbereitschaft nicht nur in unseren Arbeitsgruppenseminaren. Danken möchte ich auch den Leitern und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Heinzel, Prof. Liebmann und Dr. habil. Imhof für das konstruktive und gute Arbeitsklima.

Für Ihre mentale Unterstützung, besonders in der schwierigen Phase der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder und seiner Freundin danken.

Meinen Dank möchte ich auch gegenüber meinen Freunden ausdrücken, die mir durch Korrekturlesen und bei Softwareproblemen behilflich waren.

Mein besonderer Dank gilt meiner meiner Frau Belinda und meinem Sohn Leander, die mich jederzeit unterstützt haben und mir die Zerstreuung ermöglicht haben, die das Salz in der Suppe ausmacht.